



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Estudio de la distribución ambiental de fármacos de origen pecuario y evaluación de alternativas de mitigación en aguas contaminadas”

Tesista: Lucas L. Alonso

Director/a: Damián J. G. Marino

Codirector/a: Alberto L. Capparelli

Año: 2020

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Centro de Investigaciones del Medioambiente (CIM) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Damian J. G. Marino y la codirección del Dr. Alberto L. Capparelli. El mismo se pone en consideración de las autoridades de la Universidad Nacional de La Plata, con el objeto de acceder al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

Lic. Lucas L. Alonso

Dr. Damián J. G. Marino

Director

Dr. Alberto L. Capparelli

Codirector

Agradecimientos

A CONICET, por el otorgamiento de la beca doctoral para llevar adelante mis estudios de posgrado.

A los proyectos:

- PICT2014-0919 “Flujo de nutrientes, distribución de contaminantes, impactos ambientales de actividades productivas y alternativas de mitigación en el sistema de humedales del Delta del Paraná (Delta Entrerriano)”.
- 11/X801 “Flujo de nutrientes, distribución de contaminantes, impactos ambientales de actividades productivas y alternativas de mitigación en el sistema de humedales del Delta del Paraná (Delta Entrerriano)”.
- X866 “Flujo de nutrientes, distribución de contaminantes, impactos ambientales de actividades productivas y alternativas de mitigación en el sistema de humedales del Delta del Paraná (Delta Entrerriano) y Cordón Hortícola Platense”.

Por el soporte financiero proporcionado para el desarrollo del presente trabajo.

A la experimental de INTA – Paraná, y en particular al grupo de trabajo de la Dra. Ma. Carolina Sasal, por su colaboración en los muestreos, en la realización de los ensayos de movilidad en suelos y su gran disposición a colaborar en todas las instancias de este trabajo.

A la experimental de INTA – Balcarce, y en particular a la Dra. Virginia Aparicio y el Dr. Jose Luis Costa, por facilitar el acceso al sistema UHPLC-MS/MS para el análisis de las muestras de este trabajo.

Al Departamento de Ingeniería Química del Instituto Tecnológico de Buenos Aires (ITBA) dirigido por Jorge Stripeikis, a la Dra. Anna Serra-Clusellas y al Dr. Julian Rengifo Herrera, por su colaboración con el diseño y ejecución de ensayos de fotodegradación de antibióticos.

A Alejandro Muñoz y Silvia Parizzia, por su colaboración con reactivos analíticos específicos y la disposición de espacios para realizar ensayos.

A Pablo Zarragoicoechea, por su excelente disposición para colaborar con los muestreos freáticos realizados en Saladillo.

Al Dr. Pablo M. Demetrio, por su colaboración y aportes formativos en aspectos estadísticos.

A la Prefectura Nacional por su colaboración con la inmensa logística en las campañas de muestreo en la cuenca del Paraná-Paraguay y Uruguay.

A la Dra. Jezabel Primost, por su colaboración en materia logística y en el muestreo de los sitios del Delta del Paraná. Por la pasión y el compromiso que contagia al mencionar el humedal.

A la agrupación ECOS de Saladillo, por su acompañamiento y colaboración con los muestreos en la zona. También agradecerles por el trabajo que realizan promoviendo formas de producción agroecológicas, superadoras frente al modelo hegemónico.

A la organización ReAct, especialmente a la sección ReAct Latinoamérica. Al equipo de trabajo liderado por el Dr. Arturo Quizhpe, por su enorme dedicación y trabajo en materia de difusión y realización de proyectos que permitan trabajar en la concientización de la problemática de la resistencia microbiana a antibióticos con múltiples enfoques. Además, agradezco la calidez humana al recibirme en su país durante el encuentro “Alimentación, Antibióticos y Salud” (Cuenca, Ecuador – 2019). Por los proyectos que vendrán.

A mi país, por la educación pública, gratuita y de calidad.

A la UNLP, por trabajar incansablemente en promover y generar espacios de articulación social, acercando la universidad a los sectores populares y de construcción colectiva de conocimiento. Por su posicionamiento y acompañamiento en los trabajos realizados. A la Facultad de Cs. Exactas por ser mi casa de estudios durante mi carrera de grado y posgrado. Por la conformación de un espacio como el Programa Ambiental de Extensión Universitaria, poniendo equipamiento de alta complejidad al servicio de las comunidades.

A la Dra. Alicia E. Ronco, quien fuera co-directora de este trabajo y una gran mentora en materia profesional y personal. Gracias Nina.

A la cátedra de Química General de Correlación (para Cs. Naturales), por su paciencia, su calidez y su compañerismo, fomentando el crecimiento personal en el rol docente.

Al instituto CIM y su personal, por recibirme desde 2010 para desarrollar mis prácticas laborales y acompañarme en los procesos de crecimiento personal y profesional desde entronces.

A Alberto Capparelli, por su confianza plena en todo momento, su asesoramiento y su apoyo en las decisiones tomadas sobre el presente trabajo.

Al proyecto de extensión EMISA, por ser mi espacio de militancia, por los espacios de discusión, de formación. Por la gente que me permitió conocer, por las interacciones con otros espacios, y por los momentos compartidos. Por recordarme siempre la duda: “¿qué y para quién es la ciencia?”.

A Marcos, Florencia y Camila, por la paciencia y especialmente la confianza en los espacios de aprendizaje mutuo que compartimos en este tiempo.

A mis afectos, todos los que nunca se acordaban en que trabajé este tiempo, pero así y todo me escucharon solemnemente cada anécdota compartida. A mi familia por su apoyo constante. A mis amigos, los cercanos y los que están más lejos. Gracias por escucharme siempre.

A Juan, por su compañía, su amor, y su paciencia en todo momento.

A mis padres y a mi hermano, por su incondicionalidad en cada momento y cada paso de mi vida.

Y a un grupo de personas fundamentales para esta tesis. Este trabajo es producto de una lógica colectiva, que, si bien responde a un logro individual, se basa en los esfuerzos de un grupo de compañeros, de trabajadores, de amigos. A Damián por ser el líder de este equipo hermoso de trabajo, por ese cerebro prodigioso y su dedicación no solo profesional sino personal hacia la construcción de este espacio que formamos. Por la confianza que me diste y el empuje que pusiste desde el día 0. A Cari, por bancarme y acompañarme en todas, y ser un gran sostén emocional del equipo. Y a mis compañeros, con quienes desinteresadamente y contra las lógicas competitivas de este sistema académico, compartimos estos años de trabajo llenos de múltiples emociones, logros, desaciertos, y amistad. Por muchos más.

¡Gracias!

INDICE

1. Marco Teórico	2
1.1. El modelo de producción de animales	2
1.2. Antibióticos	5
1.2.1. Usos y eliminación	6
1.2.2. Propiedades fisicoquímicas.....	8
1.2.3. Antecedentes ambientales	4
1.3. Consecuencias Ambientales	7
1.3.1. Efectos sobre biota acuática	7
1.3.1. Resistencia microbiana	8
1.4. Estrategias de degradación.....	11
1.4.1. Fotodegradación	11
1.4.2. Humedales	12
1.5. Consideraciones.....	13
2. Hipótesis y objetivos	25
2.1. Hipótesis.....	25
2.2. Objetivos	25
2.2.1. Objetivo general.....	25
2.2.2. Objetivos específicos.	25
3. Metodologías analíticas para detección de ionóforos y tetraciclinas	28

3.1.	Resumen del capítulo.....	28
3.2.	Fármacos de estudio.	28
3.3.	Metodologías de pretratamiento de muestras.....	28
3.3.1.	Cromatografía líquida y espectrometría de masas.....	28
3.4.	Materiales	33
3.4.1.	Instrumental.....	33
3.4.2.	Reactivos	33
3.4.3.	Estabilidad de las soluciones.....	34
3.5.	Parámetros de ionización para detección de ionóforos por HPLC-MS.....	36
3.5.1.	Fragmentación	43
3.6.	Parámetros cromatográficos para la separación de antibióticos en un sistema HPLC-MS..	46
3.6.1.	Caudal	46
3.6.2.	Solvente	47
3.6.3.	Inyección	48
3.6.4.	Columna	48
3.7.	Comparación HPLC-MS – UHPLC-MS/MS	49
3.7.1.	Transiciones detectadas	51
3.8.	Parámetros de calidad del método	55
3.8.1.	Sensibilidad y límites de detección y cuantificación instrumentales	55
3.8.1.	Repetibilidad	57

3.8.2.	Linealidad	58
3.8.3.	Otros parámetros cromatográficos para la técnica UHPLC	59
3.8.4.	Tiempo de análisis.....	59
3.9.	Tetraciclinas.....	60
3.9.1.	Parámetros de ionización	60
3.9.2.	Condiciones de corrida cromatográfica.....	61
3.9.3.	Parámetros del método: Linealidad, repetibilidad y sensibilidad	62
3.10.	Metodologías de pre-tratamiento para el análisis de ionóforos y tetraciclinas	63
3.10.1.	Secado de muestras	63
3.10.2.	Aguas	64
3.10.3.	Sólidos en suspensión (SS)	67
3.10.4.	Metodología alternativa.....	69
3.10.5.	Metodología alternativa de análisis para aguas (M.A.)	70
3.11.	Matrices Sólidas – Suelos, Sedimentos y Camas de Pollo	74
3.11.1.	<i>QuEChERS</i>	74
3.11.2.	Metodología alternativa.....	80
3.12.	Resultados Relevantes.....	83
4.	Estudio de la movilidad de fármacos veterinarios desde su aplicación en suelos agrícolas	96
4.1.	Introducción	96
4.2.	Materiales y métodos	99

4.2.1.	Ensayo y simulación de escorrentía superficial	99
4.2.2.	Toma de muestras	103
4.2.3.	Análisis fisicoquímico	105
4.2.4.	Análisis instrumental.....	106
4.2.5.	Reactivos y solventes	106
4.2.6.	Procedimientos de trabajo para el aseguramiento de resultados	107
4.3.	Resultados y discusión	107
4.3.1.	Ensayo de simulación de lluvia	107
4.3.2.	Correlaciones temporales	115
4.3.3.	Movilidad y persistencia de los ionóforos	117
4.3.4.	Estudio de la movilidad de antibióticos hacia la capa freática.....	118
5.	Dinámica ambiental de antibióticos en la región pampeana	132
5.1.	Introducción	132
5.2.	Metodología	133
5.2.1.	Área de estudio – región pampeana.....	133
5.2.2.	Sitios y campañas estudiadas	134
5.2.3.	Muestreo.....	137
5.2.4.	Caracterización Fisicoquímica.....	139
5.2.5.	Análisis de antibióticos	140
5.2.6.	Análisis de información.....	141

5.3. Resultados y discusión	142
5.3.1. Descripción estadística de los datos regionales	142
5.3.2. Calidad de agua de la región pampeana – parámetros fisicoquímicos generales	144
5.3.3. Ingreso y transporte de antibióticos veterinarios en ambientes acuáticos.	145
5.3.4. Distribución y reparto de antibióticos veterinarios en ecosistemas acuáticos y factores que los influyen.....	168
5.3.5. Los humedales como sistemas de depuración natural.	179
5.3.6. Degradación de antibióticos	180
5.4. Efectos en la salud ambiental	185
6. Conclusiones	200
6.1. Consideraciones previas.....	200
6.2. Conclusiones finales	201
Anexo I – Materiales y equipamiento utilizados	206
Reactivos y solventes.....	206
Materiales	207
Instrumental.....	208
Herramientas informáticas	209
Anexo II – Resultados completos de las diferentes estrategias analíticas abordadas para reportar estimadores estadísticos poblacionales	210

Contribuciones científicas

I) Publicaciones en revistas científicas

a) Trabajo publicado relacionado con la tesis

- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Capparelli, A.L., Marino, D.J.G., 2019. Behavior of ionophore antibiotics in aquatic environments in Argentina: The distribution on different scales in water courses and the role of wetlands in depuration. Environ. Int. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105144>

b) Otros:

- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Agustina Etchegoyen, M., Marino, D.J., 2018. Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. Sci. Total Environ. 645, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.134>
- Mac Loughlin, T.M., Peluso, M.L., Etchegoyen, M.A., Alonso, L.L., de Castro, M.C., Percudani, M.C., Marino, D.J.G., 2018. Pesticide residues in fruits and vegetables of the argentine domestic market: Occurrence and quality. Food Control 93, 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.041>

II) Publicaciones a reuniones científicas nacionales

a) Trabajo publicado relacionado con la tesis

- **Título del trabajo:** Monitoreo y distribución de fármacos de uso veterinario en agua y material particulado en ríos y arroyos de zonas productivas de la Región Pampeana, Argentina. **Poster – Resumen.** **Autores:** Alonso, L.L.; Capparelli, A.L.; Ronco, A.E; Aprigliano, N; Marino, D.J. **Lugar y Fecha:** VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC, Capítulo Argentino). Córdoba, Argentina. **2016**
- **Título del trabajo:** Estudio de la variación temporal de antibióticos ionóforos en aguas subterráneas de un sistema de cría bovina intensiva (feedlot). **Poster – Resumen – Premiado.** **Autores:** Alonso, L.L.; Capparelli, A.L.; Zarragoicoechea, P., Marino, D.J. **Lugar y Fecha:** VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC, Capítulo Argentino). San Luis, Argentina. **2018**
- **Título del trabajo:** Estudio de la movilidad de antibióticos ionóforos provenientes de camas de pollo aplicadas en suelos agrícolas a través de procesos de escorrentía superficial. **Poster – Resumen.** **Autores:** Navarro, M.; Alonso, L.L.; Sasal, M.C.; Gabioud, E.; Capparelli, A.L.; Marino, D.J. **Lugar y Fecha:** VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC, Capítulo Argentino). San Luis, Argentina. **2018**

- **Título del trabajo:** Impacto de la actividad agrícola y ganadera en la cuenca del río Gualaguay, Entre Ríos, Argentina. Poster – Resumen. **Autores:** Mac Loughlin, T.M.; Alonso, L.L.; Peluso, M.L.; Marino, D.J. **Lugar y Fecha:** XIV Simpósio Latino-Americano de Química Analítica Ambiental, Bento Gonçalves – Brasil. **2019**
- **Título del trabajo:** Análisis de antibióticos poliéteres ionóforos (API) en suelos hortícolas con aplicación de enmiendas orgánicas. Poster – Resumen. **Autores:** Navarro, M.; Barbieri, S.C.; Alonso, L.L.; Marino, D.J. **Lugar y Fecha:** XIV Simpósio Latino-Americano de Química Analítica Ambiental, Bento Gonçalves – Brasil. **2019**

b) Otros:

- **Título del trabajo:** Monitoreo de las cuencas del Gran La Plata. Hacia la construcción de un Observatorio Ambiental. **Poster** – Resumen. **Autores:** C. Apartin, L. Cano, L. Elordi, L. Alonso, N. Sabbione, D. Andrinolo, A. Ronco. **Lugar y Fecha:** Argentina y Ambiente 2015. II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental. II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental. CABA, Argentina. **2015**
- **Título del trabajo:** Experiencias del Espacio Multidisciplinario de Interacción SocioAmbiental – EMISA. **Exposición Oral** – T. Completo. **Autores:** Alonso, L.L.; Etchegoyen, M.A.; (...); Peluso, L.; Marino, D.J. **Lugar y Fecha:** V Jornadas de Extensión del Mercosur. Tandil, Argentina. **2016**
- **Título del trabajo:** Calidad del agua de lluvia utilizada como fuente de agua para consumo en Isla Paulino y zonas ribereñas del partido de Berisso (Buenos Aires). **Autores:** Alonso L.L.; Bernasconi C.; Orofino M.L.; Rojo, M.; Stoeff Belkenoff, I.; Navarro, M.; Orofino A.; Manfredi, L. N.; Alvarez, N.; Apartin, C. D.; Córdoba, J.; Peluso L. **Nombre y lugar del evento:** VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC, Capítulo Argentino). Córdoba, Argentina. **2016**
- **Título del trabajo:** Los campamentos socioambientales como plataforma integral de diagnóstico de campo, de salud colectiva. **Autores:** Percudani, M.C., de Castro, M.C, Stimbaum, C., Stoeff Belkenoff, I., Davidovich, I., Mac Loughlin, T.M., Gonzalez, P.V., Barbieri, S.C., Vittori, S., Etchegoyen, M.A., Alonso, L., Bernasconi, C., Muntaner, L., Galarza, M.J., Peluso, L., Marino, D.J. **Nombre y lugar del evento:** VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC, Capítulo Argentino). Córdoba, Argentina. **2016**
- **Título del trabajo:** Respuestas a demandas sociales ante problemáticas y accidentes ambientales. Caso de estudio: Derrame de 2,4-D en la localidad de San José de la Esquina. **Poster** - Trabajo Completo. **Autores:** Percudani, M.C; Vittori, S; Barbieri, S.; Navarro, M; Stoeff Belkenoff, I; Orofino, M. L; Peluso, M. L; Alonso, L L. **Lugar y Fecha:** IV Congreso Internacional de Salud Socioambiental. Rosario, Argentina. **2017**
- **Título del trabajo:** Estudio de presencia de plaguicidas en productos frescos del área metropolitana de Buenos Aires. **Exposición Oral** – Resumen. **Autores:** MacLoughlin T.M.; Peluso, M.L.; Etchegoyen, M.A.; Alonso, L.L.; de Castro, M.C.; Percudani, M.C.; Marino, D.J. **Lugar y Fecha:** VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC, Capítulo Argentino). San Luis, Argentina. **2018**
- **Título del trabajo:** Respuestas a demandas sociales ante problemáticas ambientales derivadas del uso de agrotóxicos: los Campamentos Socioambientales como plataforma integral de diagnóstico

territorial. **Poster** – T. Completo. **Autores:** Peluso, M.L.; Vittori, S.; Etchegoyen, M.A.; Bernasconi, C.; Mac Loughlin, T.M.; Barbieri, S.C.; Alonso, L.L.; (...); Apartin, C.D.; Albea, J.; Verzeñassi, D.; Marino, D.J. **Lugar y Fecha:** Jornadas Nacionales de Extensión – Uruguay. **2018**

III) Formación de recursos humanos

Tutorías

- 2017-2018. Trabajo final de grado (Lic. En Química y Tecnología Ambiental) – Lic. Marcos Navarro. “Estudio de la movilidad en suelos de antibióticos usados en producción animal”
- 2019- en curso. Trabajo final de grado (Lic. En Química y Tecnología Ambiental) – Estudiante Florencia C. Urruchua. “Caracterización de la dinámica ambiental del antibiótico Monensina, mediante estudios de microcosmos”
- 2019- en curso. Trabajo final de grado (Lic. En Química y Tecnología Ambiental) – Estudiante Camila Sánchez Urday. “Estudio de translocación del antibiótico monensina en cultivos de lechuga criolla (Lactuca sativa)”

Capítulo 1 – Marco teórico



1. Marco Teórico

1.1.El modelo de producción de animales

La producción de alimentos en un mundo cuya población ha alcanzado los 7 billones de habitantes es un área prioritaria en los ámbitos de estudio (FAO, 2012). La necesidad de aumentar los volúmenes de provisiones generadas, sin sacrificar tiempo y espacio, se propone como paradigma de un modelo productivo cuya finalidad publicitada de combatir el hambre mundial, muchas veces disfraza un objetivo hegemónico de rentabilidad financiera y movimientos sobre los mercados internacionales que reduce a una escala desestimable otros costos residuales, como el futuro (actualmente, presente) impacto en la salud ambiental (FAO, 2018). Estas lógicas de producción han promovido el desarrollo e incorporación de estrategias tecnológicas modernas que van desde el avance indiscriminado sobre áreas de conservación, la introducción de organismos modificados genéticamente – patentados por monopolios comerciales – en reemplazo de especies autóctonas, la sustitución del trabajo manual por sistemas informáticos automatizados, o la utilización de agentes químicos (xenobióticos) que aceleren los tiempos de producción y eliminen perturbaciones naturales a estos sistemas, cada vez más artificiales (Barzola). En relación a este último punto, se reporta a nivel mundial el uso de más de 4.113.591 toneladas de plaguicidas en 2017 – entre los que se incluyen insecticidas, herbicidas, etc. – (FAOSTAT, 2020), y 104.779 toneladas de antibióticos de uso veterinario en 2015 (OIE, 2015) – cifra que subestima el valor real ya que a partir de los criterios de la evaluación se excluyeron fármacos como los ionóforos, que constituyen una de las familias químicas más comercializadas (Sarmah et al., 2006).

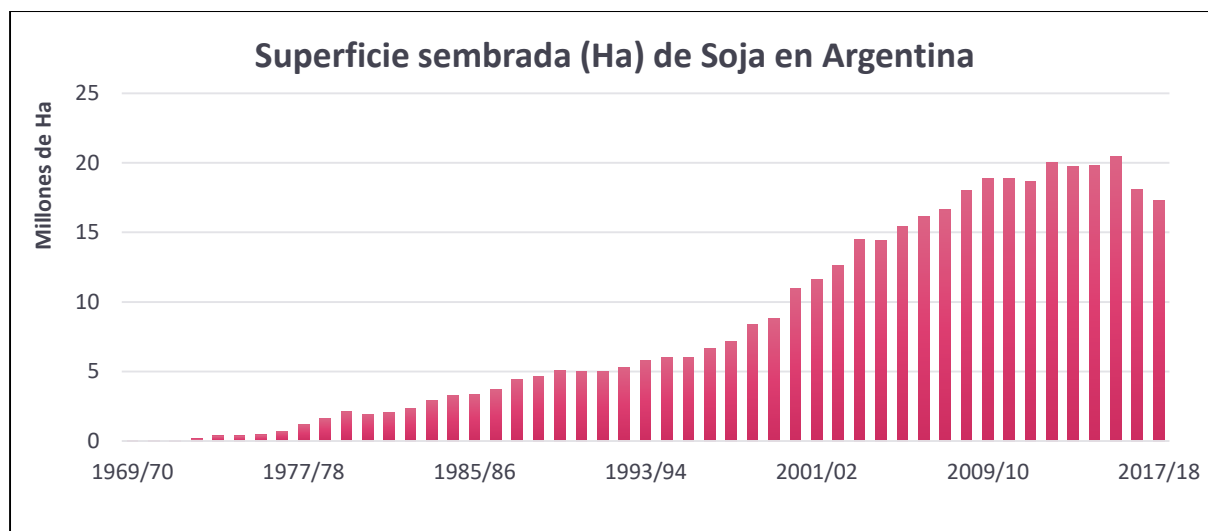


Figura 1. Superficie sembrada de soja en Argentina (1969-2018).

El uso de antibióticos en la cría animal, responde a uno de los mayores desafíos de este modelo agroproductivo dominante. La producción pecuaria ha debido adoptar fuertes estrategias de adaptación para sostener su rentabilidad frente a los cambios introducidos en el sistema agropecuario a raíz del fenómeno de agriculturización (Michelena et al., 2013). El fenómeno responde a tendencias mundiales, siendo Argentina un caso esquemático y representativo para entender las modificaciones del sistema agrícola (Leguizamón, 2014). Tradicionalmente, los sistemas de producción animal en Argentina se han caracterizado por el uso de pasturas como fuente de alimentación, con largos ciclos de cría en los que las decisiones humanas involucraban favorecer la diversidad de especies y la estabilidad de los ecosistemas (Lasanta Martínez y Errea Abad, 1997). A lo largo del siglo XX, la agricultura y ganadería co-evolucionaron, bajo condiciones extensivas o semi-intensivas, consolidando un modelo de rotación de cultivos con pasturas y forrajes anuales. Sin embargo, la intensificación agrícola en la pradera pampeana durante los '90 hasta la actualidad, caracterizada por la expansión de la frontera agrícola y el “boom” sojero (Reboratti, 2010) también estuvo acompañada por una notoria intensificación en los sistemas de producción animal (Viglizzo et al., 2010). La

introducción de sistemas de cría en “*feedlots*”, los sistemas modernos de cría avícola, son algunos cambios introducidos en la época, que intentan dar respuesta a la demanda de productos en una superficie cada vez más reducida. En la Figura 1 se puede observar el aumento de la superficie dedicada a soja (principal cultivo asociado a este modelo productivo), que, en la actualidad, aproximadamente cuadruplica el área ocupada en los 90’s. Parte de los productos generados en las grandes extensiones de cultivo (cereales, forrajeras), se dedicaron a la alimentación de los animales, estableciendo un nuevo vínculo de dependencia entre las producciones (Lasanta Martínez y Errea Abad, 1997; Sarmah et al., 2006). En la Figura 2 se presenta la evolución de la producción animal desde 1961 hasta 2017 (FAOSTAT, 2020), en el que se destaca un marcado incremento en el número de gallinas, mientras que las cabezas de bovinos y porcinos presentaron menores variaciones.

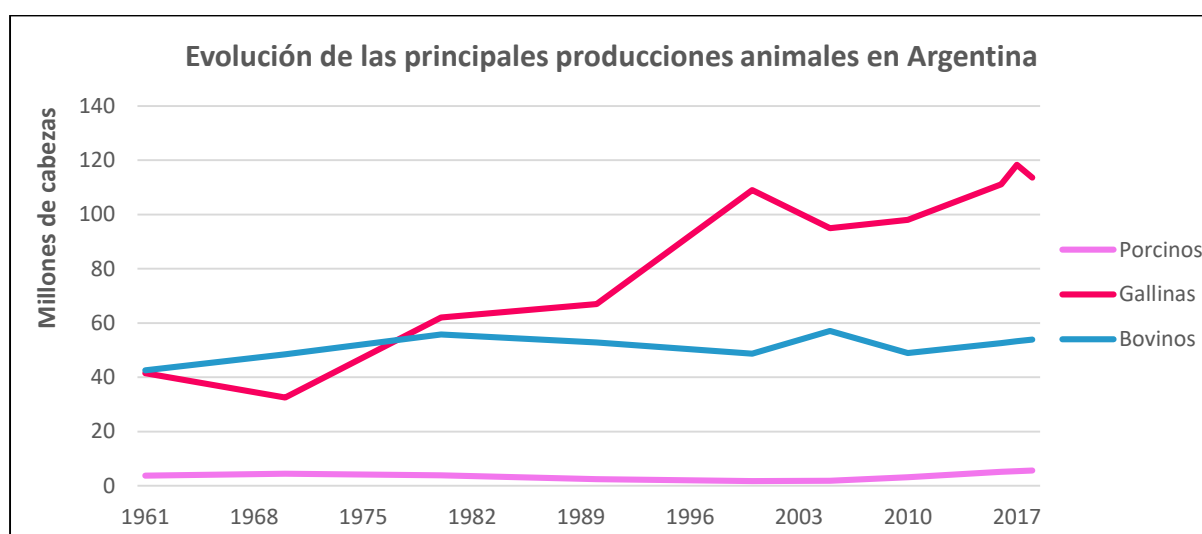


Figura 2. Evolución de las principales producciones animales en Argentina.

La adecuación de los sistemas de cría a las formas intensivas permitió sostener estos niveles de producción, sin embargo, las nuevas condiciones demandaron incorporar nuevas herramientas, que permitan abarcar dos puntos clave:

- Estos sistemas de cría y engorde se realizan actualmente de manera intensiva, caracterizándose por una alta densidad animal (mas de 13 aves/m² en la producción avícola) (Yoshida *et al.*, 2005; Thaxton *et al.*, 2014). Las condiciones de hacinamiento en las que se encuentran los animales favorecen la proliferación de enfermedades y su rápida propagación, representando un peligro económico-sanitario (Chapman *et al.*, 2010).
- Los tiempos de cría debieron acelerarse para poder abastecer los mercados. Para bovinos, los engordes a corral se introdujeron en las últimas etapas de cría para fomentar el engorde de los animales. En paralelo, las reglamentaciones sobre pesos mínimos por animal para la comercialización fueron disminuyendo, de manera de enviar animales al mercado que requieran menos tiempo de producción (MINAGRI, 2020).

La respuesta a estas situaciones se abordó desde la dieta. La incorporación de alimento balanceado, además de aportar los nutrientes necesarios, incorporó antibióticos de uso veterinario (AV) con fines preventivos para diversas afecciones potenciadas por la elevada densidad animal.

1.2. Antibióticos

Más de 2.000 productos farmacéuticos veterinarios se fabrican a partir de 400 ingredientes químicos activos para tratar diversas especies de animales (FDA, 2012; Sarmah *et al.*, 2006). No existen datos oficiales respecto a cantidades de uso/comercialización de estos compuestos en Argentina, y hay escasos valores mundiales (Kumar *et al.*, 2012). Según una encuesta realizada por la OIE (2015) en 155 países (incluidos 32 países americanos), la dificultad para estimar las cantidades de uso de este tipo de compuestos suele deberse a varios factores entre los que se destacan:

- La falta de marco regulatorio específico para este tipo de sustancias, y su uso específico en la producción (algunos antimicrobianos, se regulan como antiparasitarios pero no como promotores de crecimiento).
- La falta de herramientas y recursos humanos dedicados a la digitalización y armado de bases de datos.
- La falta de cooperación entre el sector privado y las autoridades nacionales en el intercambio de información.

Es importante la generación de información que registre la cantidad de fármacos veterinarios utilizados/comercializados para poder estimar así la tasa de ingreso al ambiente específica para cada compuesto (Kumar et al., 2012). Esta información es importante para el diseño y el enfoque de estudios que estratégicamente permitan abordar los casos específicos para cada región.

Para el presente estudio, se consideró información reportada en la literatura, además de consultas personales con distintas áreas (técnicos profesionales de INTA, productores, sitios de comercialización, entre otros).

1.2.1. Usos y eliminación

Los antibióticos políéters APIs (API) son ampliamente utilizados en la industria debido a su amplio espectro de respuesta contra la mayoría de especies patógenas de coccidios, su utilización como promotores de crecimiento, (Dibner y Richards, 2005; Niewold, 2007), y el poco desarrollo de resistencia en los animales (Kant et al., 2013; Landoni y Albarellos, 2015), siendo lasalocid (Avatec®), monensina (Elancoban®), salinomicina (Coxistac®) los más

utilizados (Yoshida et al., 2010). Su actividad se da en los primeros días del ciclo del coccidio, y se usan a razón aproximada del 0,01% en el alimento (Kant, et al., 2015) y en diferentes combinaciones dependiendo de la fase del ciclo de producción (Furtula et al., 2009; Kant et al., 2013). En lo que respecta a la cría de pollos, dado que la ingestión de oocitos es continua, se recomienda que la administración de APIs se realice ininterrumpidamente durante la vida del animal (hasta 45 días) (Žižek et al., 2015).

Por su parte, las Tetraciclinas (ATC) constituyen la familia de antibióticos más utilizados en la producción animal según reportes de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2015). Entre sus funciones principales, se utilizan para minimizar las infecciones bacterianas secundarias, siendo efectivas contra gran espectro de bacterias gran-positivas y gran-negativas, y el control de abscesos hepáticos, que son afecciones comunes en el engorde a corral (Bavera et al., 2002). Se destacan el uso de la tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina, como 3 de las especies químicas principales utilizadas en la industria (Sarmah et al., 2006).

La incorporación de antibióticos modifica la microflora del rumen en bovinos permitiendo una mejora sustancial de la tasa de ganancia de peso por kilo de alimento consumido. En promedio, las dosis utilizadas van desde los 3 mg/kg hasta los 150 mg/kg de alimento dependiendo del activo y tipo de organismo receptor. Para el caso de monensina (API) en bovinos, pueden utilizarse 100-750 mg activo/100 kg de animal vivo/día (Pordomingo et al., 1999) y para clortetraciclina (CTC), en aves, pueden usarse de manera continua en concentraciones promedio de 75 mg activo/kg de alimento. La oxitetraciclina, bajo uso “metafiláctico” (tratamiento preventivo de todos los animales a partir de la observación de un individuo con síntomas) se usa a dosis de 700 g de activo/1000 L de agua, sosteniendo el

tratamiento durante 14 días. A pesar de la variedad de dosis y tratamientos, se ha reportado que una fracción del fármaco suministrado no se metaboliza y es excretada por heces y orina. Evidencia de ello son concentraciones de monensina medidas en excretas frescas bovinas de 2,20 mg/kg (Yoshida et al., 2008) y de clortetraciclina en estiércol de aves y vacas de 17,68 mg/kg y 60,0 mg/kg respectivamente (Zhao et al., 2010). Al igual que lo que ocurre con fármacos de uso humano, el aumento del consumo de este tipo de sustancias y su excreción son algunas de las razones por la que este tipo de sustancias, ahora denominados contaminantes emergentes se están constituyendo un problema que debe ser estudiado con detalle

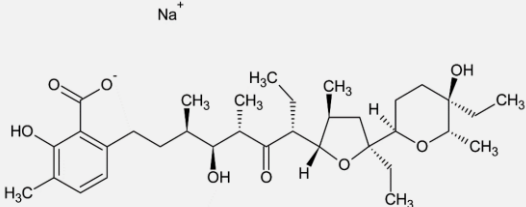
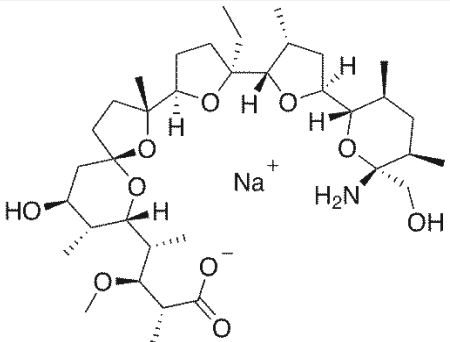
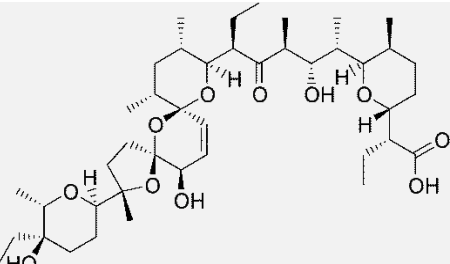
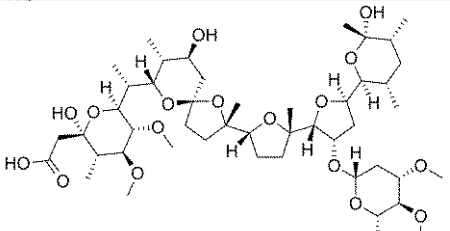
1.2.2. Propiedades fisicoquímicas

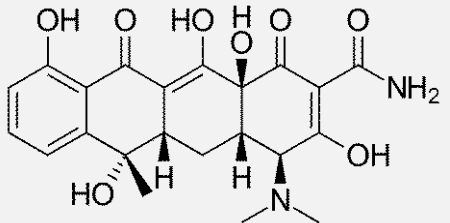
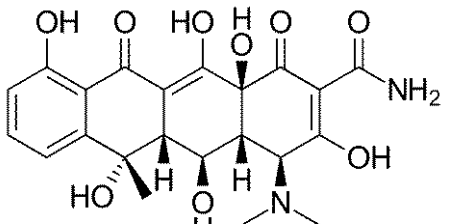
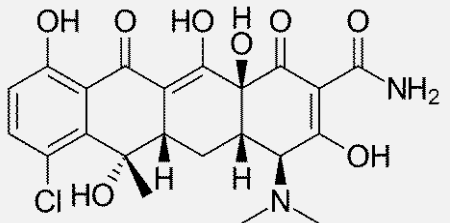
En las Tabla 1 se presentan las propiedades fisicoquímicas principales de las moléculas estudiadas. Los ionóforos son moléculas no volátiles, del tipo poliéteres, que forman complejos liposolubles de tipo “corona” con cationes mono y divalentes (Novilla, 2018). Dentro de estos compuestos, podemos encontrar lasalocid (LAS), monensina (MON), salinomicina (SAL) y maduramicina (MAD). El pKa de estos compuestos es cercano a los pKa de otros ácidos carboxílicos alifáticos (Sun et al., 2016). Los equilibrios de solubilidad y sorción de estos compuestos se encuentran condicionados por los equilibrios de formación de complejos con cationes, determinando solubilidades en un rango de entre 0,003 hasta 905 mg/L para estos compuestos (Dolliver y Gupta, 2008; Hansen et al., 2009a). La especiación de estas moléculas en solución se resume de manera genérica para los ionóforos (I) en la Ecuación 1:

$$[I_{Total}] = [I - H] + [I^{-}] + [I + Metal]$$

Ecuación 1.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los fármacos estudiados.

Fármaco	Estructura molecular	Masa molecular (g/mol)	Solubilidad en agua (mg/L, 20°C)	pKa a 25°C	Presión de vapor a 20°C (mPa)	log Kow (pH 7, 20°C)	Koc	Vida media (días)	Referencia
LAS		590,7 ^b	0,0043 ^b	4,4 ^b	-	225 ^b	125-5700 ^c	-	^a VSDB ^b Iglesias et al. (2011) ^c Sassman & Lee (2007)
MON		670,9 ^b	0,003 ^b	6,6 ^b	4.27x10 ^{-18 a}	5,43 ^b	732-15700 ^c	5,8 (estiércol) ^a	^a VSDB ^b Iglesias et al. (2011) ^c Sassman & Lee (2007)
SAL		751,0 ^b	-	6,4 ^b	-	8,5 ^b	417 ^d	64 (suelo, aeróbico) ^a	^a VSDB ^b Iglesias et al. (2011) ^d Hansen et al. (2009)
MAD		934,2 ^a	-	-	-	3,4 ^a	-	55 (estiércol) ^a	^a VSDB

Fármaco	Estructura molecular	Masa molecular (g/mol)	Solubilidad en agua (mg/L, 20°C)	pKa a 25°C	Presión de vapor a 20°C (mPa)	log Kow (pH 7, 20°C)	Koc	Vida media (días)	Referencia
TTC		444,4 ^e	1700 ^a	pKa(1)=3,33 ^e pKa(2)=7,78 ^e pKa(3)=9,58 ^e	4,11x10 ⁻¹⁸ ^a	-1,19 ^e	40000 ^a	30 (suelo, aeróbico) ^a ; 4,5 (estiércol) ^a	^a VSDB ^e Figueroa et al. (2004)
OTC		460,5 ^e	-	pKa(1)=3,22 ^e pKa(2)=7,46 ^e pKa(3)=8,94 ^e	-	-1,22 ^e	-	43,8 (estiércol) ^a	^a VSDB ^e Figueroa et al. (2004)
CTC		478,8 ^e	630 ^a	pKa(1)=3,33 ^e pKa(2)=7,55 ^e pKa(3)=9,33 ^e	2,09x10 ⁻²³ ^a	-0,41 ^e	-	30 (suelo, aeróbico) ^a	^a VSDB ^e Figueroa et al. (2004)

VSDB: Veterinary Substances DataBase. University of Hertfordshire. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/index.htm>.

LAS, lasalocid; MON, monensina; SAL, salinomycin; MAD, maduramicina; TTC, tetracycline; OTC, oxitetracycline; CTC, clortetracycline.

Esta especiación presenta un comportamiento variable con el pH, con un máximo de solubilidad en entornos de pH neutros. La especie protonada [*I-H*], predomina a pH ácido, otorgándole características hidrofóbicas en esas condiciones, mientras que la especie [*I-Metal*] se favorece en entornos neutros-alcalinos, por lo que vuelven a observarse propiedades hidrofóbicas (Sun et al., 2016). Esta distribución de solubilidad en función del pH tiene efectos en la sorción de estos compuestos, y puede afectar su distribución en ambientes acuáticos (Kim y Carlson, 2006; Sassman y Lee, 2007; Sun et al., 2016). Estos compuestos presentan elevados K_{oc} y K_{ow}, indicando gran afinidad por matrices sólidas y por fases hidrofóbicas. Sin embargo, como se discutirá en secciones posteriores, su afinidad por matrices sólidas no solo está determinada por interacciones hidrofóbicas debido al carácter iónico que presentan bajo ciertas condiciones del entorno (Sassman y Lee, 2007).

Las tetraciclinas son productos de fermentación que pueden clasificarse según su origen como “naturales” o “sintéticas”, en función de las modificaciones químicas que puedan incorporarse. Dentro de las tetraciclinas naturales, se encuentran la Tetraciclina (TTC), Oxitetraciclina (OTC) y Clortetraciclina (CTC). Las tetraciclinas son solubles en agua y alcoholes, sin embargo, son poco solubles en solventes no polares como hexano o diclorometano. En el rango de pH de 3 a 9, estos compuestos presentan un comportamiento de ión dipolar (o “zwitterión”), otorgándole propiedades relevantes en la interacción con matrices ambientales sólidas, permitiendo su interacción con sitios aniónicos y catiónicos de las partículas de suelo y sedimentos (O’Connor y Aga, 2007; Sassman y Lee, 2005). Estas moléculas también pueden formar complejos divalentes con cationes como Ca⁺² y Mg⁺², modificando así su solubilidad y su disponibilidad a interacción con los sólidos. Si bien presentan bajos K_{ow}, se ha reportado su presencia en suelos, sedimentos y sólidos en

suspensión, indicando un reparto ambiental más complejo que involucra otros más factores además de interacciones hidrofóbicas.

1.2.3. Antecedentes ambientales

A más de 30 años continuados de uso, la combinación de factores como número de individuos y volúmenes de excretas, sumadas a las propiedades fisicoquímicas mencionadas, despierta preocupación a nivel mundial a causa de la consecuente presencia de estos compuestos en el ambiente, así como de los efectos que esta contaminación trae aparejada, especialmente sobre los ecosistemas acuáticos (Boxall, 2012). Esto ha motivado distintos tipos de estudios dedicados a identificar y caracterizar distintas familias de contaminantes de preocupación emergente en el ambiente (aus der Beek et al., 2016; Boxall, 2012; Díaz-Cruz y Barceló, 2005; Hernández et al., 2007; Silva et al., 2011).

En estudios sobre sistemas acuáticos regionales se han cuantificado plaguicidas (Alonso et al., 2018; Etchegoyen et al., 2017; Peruzzo et al., 2008; Ronco et al., 2016) fármacos de uso humano (Elorriaga et al., 2012; Valdés et al., 2014) y recientemente (como producto del presente trabajo) se han publicado por primera vez en Latinoamérica, datos acerca de fármacos de uso veterinario (Alonso et al., 2019).

Tabla 2. Relevamiento de concentraciones de fármacos estudiados en distintas matrices.

Fármacos	Matriz	Media	Valor máximo	Referencia
CTC	Agua superficial		44420 ng/L	Awad et al. (2014)
CTC	Agua superficial (río)		690 ng/L	Kolpin et al. (2002)
CTC	Agua superficial (río)	40 ng/L		Kim & Carlson (2007)
CTC	Sedimento		16,3 ug/kg	Awad et al. (2014)
CTC	Sedimento		11,6 µg/kg	Kim & Carlson (2007)
CTC	Sedimento		8,27 µg/kg	Sandoz et al. (2018)
MON	Agua subterránea		390 ng/L	Watanabe et al. (2008)
MON	Agua superficial (río)		36 ng/L	Kim & Carlson (2006)
MON	Agua superficial (río)	104,71 ng/L	220 ng/L	Hao et al. (2006)
MON	Agua superficial (río)	44 ng/L		Lissemore et al., (2006)
MON	Agua superficial (río)		50 ng/L	Cha et al. (2005)
MON	Agua superficial (río)	11 ng/L		Kim & Carlson (2007)
MON	Agua superficial (río)	15,5 ng/L	16,7 ng/L	Iglesias et al. (2002)
MON	Agua superficial (río)		84365 ng/L	Sandoz et al. (2018)
MON	CDP	0,06 mg/kg	0,14 mg/kg	Furtula et al. (2009)
MON	CDP	291 µg/kg	4,057 mg/kg	Sun et al. (2013)
MON	Escorrentía superficial	2,5 ng/L	37 ng/L	Song et al. (2007)
MON	Escorrentía superficial	572 ng/L	2389	Sun et al. (2013)
MON	Sedimento		31,5 mg/kg	Kim & Carlson (2006)
MON	Sedimento		14,6 µg/kg	Kim & Carlson (2007)
MON	Sedimento		853,1 µg/kg	Sandoz et al. (2018)
MON	Suelo	101 µg/kg	183 µg/kg	Sun et al. (2013)
OTC	Agua superficial		320 ng/L	Awad et al. (2014)
OTC	Agua superficial		150 µg/L	Yan et al. (2004)
OTC	Agua superficial	1410 ng/L		Ok et al. (2011)
OTC	Agua superficial (río)		340 ng/L	Kolpin et al. (2002)
OTC	Agua superficial (río)	10 ng/L		Kim & Carlson (2007)
OTC	Escorrentía superficial	32000 ng/L		Kolpin et al. (2002)
OTC	Sedimento		1,43 ug/kg	Awad et al. (2014)
OTC	Sedimento		8,3 µg/kg	Kim & Carlson (2007)
OTC	Sedimento		1,89 µg/kg	Sandoz et al. (2018)
SAL	Agua superficial (río)		7 ng/L	Kim & Carlson (2006)
SAL	Agua superficial (río)		0,04 ng/L	Cha et al. (2005)
SAL	Agua superficial (río)	6 ng/L		Kim & Carlson (2007)
SAL	CDP	6,50 mg/kg	8,9 mg/kg	Furtula et al. (2009)
SAL	CDP	4,607 mg/kg	21,878 mg/kg	Sun et al. (2013)
SAL	Escorrentía superficial	<LDM	9022	Sun et al. (2013)
SAL	Sedimento		30,1 mg/kg	Kim & Carlson (2006)
SAL	Sedimento		3,7 µg/kg	Kim & Carlson (2007)
TTC	Agua superficial		254820 ng/L	Awad et al. (2014)
TTC	Agua superficial	580 ng/L		Ok et al. (2011)
TTC	Agua superficial (río)	20 ng/L		Kim & Carlson (2007)
TTC	Sedimento		75,7 ug/kg	Awad et al. (2014)
TTC	Sedimento		32,8 µg/kg	Kim & Carlson (2007)

En cuerpos de agua superficial se han publicado concentraciones que van desde los ng/L a los µg/L de todos ellos (Zhou et al., 2011; Iglesias et al., 2014) y en agua subterráneas se ha

detectado monensina en niveles superiores a los 100 ng/L (Lapworth et al., 2012). Los desechos sólidos de los criaderos frecuentemente son utilizados como abonos en campos, por lo que se han estudiado en suelos debido a los posibles aportes difusos hacia los cuerpos de agua por escorrentía, con niveles de CTC cuantificados en suelos de 900 µg/kg (Kemper, 2008) y de API de hasta 350 µg/kg (Yoshida et al., 2008). En sedimentos también han sido detectadas ambas familias de sustancias (Awad et al., 2014). Vale destacar la falta de estudios en detalle de niveles de estos compuestos en ambientes de Argentina. Los niveles y frecuencias de detección en cuerpos de agua superficial y subterránea y los potenciales riesgos biológicos asociados, hacen relevante la evaluación de posibles estrategias destinadas a la disminución de sus niveles en la hidrósfera.

La presencia de ionóforos en aguas superficiales, suelos y sedimentos de fondo ha sido reportada en los Estados Unidos, la UE y Asia. Se detectó MON a niveles de 5 a 350 µg/kg en suelos de EE. UU. (Sun et al., 2013). Además, se detectaron hasta 2389 ng/L de MON y 9022 ng/L de SAL en el agua de escorrentía de suelos fertilizados con enmiendas de origen pecuario, lo que indica la movilidad de los antibióticos y el papel de la escorrentía como fuente principal de estos compuestos hacia cuerpos de agua. En particular, MON, SAL y LAS se registraron en aguas en concentraciones que van desde 1,000 µg/L a 1172 µg/L, con concentraciones máximas de 40 µg/L de MON detectadas en lagunas de aguas residuales (Kim y Carlson, 2006; Lissemore et al., 2006; Sassman y Lee, 2007). Además, estos contaminantes se detectaron en muestras de sedimentos del fondo a concentraciones más altas que los niveles presentes en el agua de las mismas corrientes (Kim y Carlson, 2006), adicionalmente MON también se encontró en aguas subterráneas cerca de instalaciones ganaderas con un valor máximo de 2350 µg/L (Bartelt-Hunt et al., 2011).

En los últimos años, un número creciente de estudios en todo el mundo proporciona evidencia de la presencia de los AV en excretas de animales que pueden considerarse como su fuente, siendo receptores de estos procesos aguas superficiales y subterráneas, sedimentos fluviales y suelos en concentraciones que podrían tener un potencial impacto en los ecosistemas (Sarmah et al., 2006). Considerando el amplio uso en Argentina de estos compuestos, por la extensión de la producción de carnes y relacionados, asombra la falta de estudios en detalle de concentraciones y efectos de estos contaminantes en ambientes de la región. Los niveles y frecuencias de detección en distintos ambientes acuáticos del mundo, y ahora en Argentina, en conjunto con los potenciales efectos sobre biota autóctona, hace relevante y urgente la evaluación de posibles estrategias destinadas a la remoción de ellos en la hidrósfera.

1.3. Consecuencias Ambientales

1.3.1. Efectos sobre biota acuática

El ingreso de los API en el ambiente y su movilidad hacia cuerpos de agua superficial genera discrepancias respecto de los posibles efectos adversos que pueden tener en esta esfera ambiental sobre la biota acuática. En la mayoría de los casos, los riesgos en salud humana y ecosistemas acuáticos no se encuentran bien caracterizados (Celiz et al., 2009), en particular la toxicidad sinérgica o antagonista que puede ocurrir a partir de mezclas complejas (Pignatello et al., 2010). Si bien los antibióticos están diseñados para influir directamente sobre las bacterias, también pueden afectar a una variedad de organismos no objetivo

(Kummerer, 2001), incluidos el zooplancton (Hillis et al., 2007), peces (Park y Choi, 2008) y algas (Halling-Sørensen, 2000).

Se han reportado efectos adversos de la adición de MON en la abundancia de zooplancton, la riqueza de especies y la biomasa de fitoplancton en estanques artificiales (Hillis et al., 2007). Wollenberger et al. (2000) demuestra los efectos crónicos (asociados a la reproducción) de la exposición a ciertos antibióticos en *Daphnia magna* (Wollenberger et al., 2000). Sobre el mismo organismo, se han reportado efectos en la reproducción a causa de TTC (Kim et al., 2012). Los efectos de los antibióticos en bacterias y microalgas se encuentran generalmente de 2 a 3 órdenes de magnitud por debajo de los valores tóxicos para niveles tróficos más altos (Robinson et al., 2007; Wollenberger et al., 2000). Los datos de efectos tóxicos sobre especies acuáticas superiores que se encuentran en la literatura están generalmente en el rango de mg/L, habitualmente por encima de los valores ambientales, sin embargo, existen trabajos que proponen la identificación de ionóforos como contaminantes que presentan riesgo ambiental (Hansen et al., 2009b). Es para destacar que no existen niveles guía ni regulaciones para este tipo de compuestos en aguas en la región.

1.3.2. Resistencia microbiana

En la Tabla 3 (Kumar et al., 2012), se exponen las ventajas y desventajas del uso de antibióticos en la producción animal. La exposición continua a estos micro contaminantes puede causar efectos perjudiciales en el microbioma, afectando comunidades microbianas específicas, o promoviendo poblaciones resistentes a los mismos (Hilaire et al., 2020; Kuppusamy et al., 2018; Sarmah et al., 2006). La incorporación de MON y OTC al suelo no afecta directamente a la comunidad microbiana pero sí al microbioma, afectando comunidades procariotas de las raíces y estos efectos pueden modificar los ciclos de

nutrientes del suelo (Hilaire et al., 2020). Además, los productos de hidrólisis de MON también pueden afectar la desnitrificación en suelos y aguas subterráneas (Sun, 2014).

*Tabla 3. Importancia del uso de antibióticos como promotores del crecimiento.
Adaptado de Kumar et al. (2012).*

Problema general		Ventajas	Desventajas
Salud	Control de ciertas enfermedades (principalmente entéricas) hasta cierto punto		1. Desarrollo de resistencia a los antimicrobianos 2. Enmascara la enfermedad subclínica y la infección 3. Limita los incentivos para mejoras higiénicas
Bienestar	Alivia y amortigua los síntomas de la enfermedad		Camufla el estrés asociado con la enfermedad subclínica
Agricultura	Aumenta la producción		Estimula e intensifica la producción animal
Alimentación	Mejora la vida útil		1. Camufla la mala calidad del alimento 2. Impide mejoras en la formulación del alimento 3. Desarrollo de alternativas
Sistema de producción	Reduce la demanda de mano de obra debido a métodos de producción más intensos Mejor seguridad del cultivo		1. Impide el desarrollo de sistemas de producción amigables con los animales 2. Desarrollo de resistencia a antibióticos incluso para patógenos de animales de granja
Ambiente	Mejor utilización de los alimentos; menos estiércol		Aumenta la reserva ambiental de genes resistentes a antibióticos; residuos de antibióticos
Salud humana	Ninguna		1. Amenaza de infección por patógenos resistentes a los antibióticos. 2. Aumento del costo de la atención médica debido a infecciones inmanejables 3. Acorta la vida económica de los antimicrobianos médicos 4. Riesgos laborales por exposición a aerosoles y polvo contaminado con antimicrobianos

La resistencia microbiana ocurre cuando los antibióticos se vuelven incapaces de controlar o inhibir el crecimiento de colonias de bacterias. La incorporación de grandes cantidades de antibióticos a causa del sobre-uso en la industria animal es una de las causas de este fenómeno (Fahrenfeld et al., 2014). Algunas bacterias naturalmente resisten a ciertos

antibióticos, sin embargo, la resistencia también se puede deber a mutaciones genéticas o al traspaso de la resistencia desde otra bacteria. Cuando las nuevas generaciones de bacterias heredan la resistencia de las colonias formadoras, se dice que hubo transferencia vertical de resistencia a antibióticos en las poblaciones; la transferencia horizontal ocurre cuando las bacterias comparten o intercambian material genético con otras, incluso entre distintas especies. La presencia de múltiples genes de resistencia en una bacteria, la convierte en lo que popularmente se conoce como “super-bacteria” o “bacteria multiresistente” (Kumar et al., 2012).

La presencia de estas bacterias en ambientes acuáticos, suelos o alimentos, a causa de su distribución ambiental, expone a los humanos a enfermedades difíciles de tratar con las herramientas de la medicina actual (Tasho y Cho, 2016). En este sentido, el uso de ionóforos presenta una ventaja: no existen análogos en medicina humana, por lo tanto, su uso en la producción se ve potenciado debido a que no se considera que la posible resistencia presente el mismo riesgo en la población. (Hansen et al., 2009a). Sin embargo, estudios indican que es posible que estos compuestos también den lugar a transferencia horizontal de genes de resistencia, o incluso potencien la resistencia a otros antibióticos (Butaye et al., 2003; Furtula et al., 2010; Pei et al., 2006). Para las tetraciclinas, desde 1958 se han reportado casos de cepas resistentes, provenientes de la actividad avícola. Se han detectado genes de resistencia en bacterias ambientales, junto a concentraciones de estos antibióticos, indicando el efecto que tiene su ocurrencia sobre la microbiota de los sistemas acuáticos (Chee-Sanford et al., 2001; Peak et al., 2007; Tao et al., 2010).

1.4. Estrategias de degradación

1.4.1. Fotodegradación

Teniendo en cuenta la movilidad de estos compuestos y su persistencia o pseudo-persistencia, existen diversas estrategias para la remediación de aguas contaminadas, entre las cuales se encuentran los llamados procesos de oxidación avanzados (AOP, sigla ampliamente utilizada de su denominación en inglés *Advanced Oxidation Process*), las que cubren una amplia gama de tecnologías entre las cuales se encuentra el empleo de TiO_2 y de las técnicas Fenton, Fenton-solar y UV/ H_2O_2 entre otras. La aplicación de las técnicas AOP constituyen una herramienta económicamente viable para mineralizar distintos tipos de contaminantes o avanzar un nivel de tratamiento hasta que, aquellos que son refractarios a los tratamientos convencionales o de menor demanda energética, puedan ser eliminados o reducidos de los ambientes. Estos se fundan principalmente en la producción del radical $\text{HO}\bullet$, que es un agente oxidante muy reactivo y no específico. En la literatura internacional, para el tratamiento de aguas contaminadas, como métodos de bajo costo de remediación, se tienen a la fotodegradación por uso de semiconductores, que utilizan TiO_2 y la acción combinada de la luz solar (Malato et al., 2002). La respuesta a la fotodegradación de este tipo de sistemas frente a distintas sustancias es muy variable aun ante pequeñas modificaciones estructurales de la molécula (Andreozzi et al., 2003). A su vez, estas respuestas dependen de la concentración de especies como nitratos y contenido de materia orgánica (Nileu et al, 2008; Mostofa et al., 2012) y estas tecnologías no pueden aplicarse a efluentes y aguas con altos contenidos de nutrientes y materia orgánica por la baja energía puesta en juego (Homem y Santos, 2011). La degradación de compuestos polares en matrices acuosas complejas incluye el uso de lodos activados aeróbicos y anaeróbicos (Johnson y Sumpter, 2001) y métodos convencionales de floculación,

filtración y tratamiento químico de degradación/sorción específicos de manera combinada (Homem y Santos, 2011).

1.4.2. Humedales

La biorremediación se considera una tecnología atractiva, que da como resultado la transformación completa de compuestos orgánicos a productos finales inocuos como CO₂ y H₂O. Además, se considera un medio económico y respetuoso con el ambiente (Ferreira et al., 2016; Vasiliadou et al., 2014). Los procesos biológicos simples, como los humedales artificiales o los contactores biológicos rotativos (biodiscos), resultan prometedores a la hora de eliminar contaminantes emergentes. Estos sistemas son un tratamiento alternativo al que pueden ser sometidos los contaminantes emergentes, que pueden permitir su remoción por efecto de la biodegradación y de la absorción en las plantas (Li et al., 2014). Debido a las cargas altamente impredecibles y variables de los efluentes agrícolas, los humedales, con una mayor capacidad para manejar las inmovilizaciones y los extremos, parecen ser la mejor opción de tratamiento (Hussain et al., 2011; Li y Tan, 2014). Estos imitan a los naturales y consisten en un mono o policultivo de plantas macrófitas dispuestas en lagunas, tanques o canales poco profundos (Caballero Lajarín, 2013). Estos humedales pueden funcionar con poca pérdida de eficiencia ante variaciones propias de la actividad agroproductiva como son los volúmenes de agua y niveles de contaminantes típicos de las escorrentías agrícolas (Sim et al., 2008). Aunque se conoce el alto uso y la persistencia ambiental de antibióticos como ionóforos y tetraciclinas, se han explorado escasamente las técnicas de control y eliminación de estos antibióticos en ambientes naturales (Ramaswamy et al., 2010). Los pocos resultados indican una baja

eficiencia en la remoción de estos contaminantes desde sistemas artificiales (Hussain y Prasher, 2011).

Por otra parte, los humedales naturales, desempeñan funciones esenciales (de hecho, servicios) en el ambiente, dependiendo de los ciclos de inundación-sequía, y tienen la capacidad de amortiguar los efectos de las inundaciones, reducir la erosión, promover la sedimentación y transformar nutrientes y contaminantes en forma disuelta y particulada por combinación de procesos físicos, químicos y biológicos (Hammer, 1992; Depetris y Kempe, 1993). Retomando los conocimientos encontrados para sistemas de humedales artificiales, y dado que se han reportado otros contaminantes de origen agrícola como pesticidas en los afluentes y afluentes del delta del río Paraná (Etchegoyen et al., 2017), es importante conocer el aporte de antibióticos a un humedal a escala real como el Delta del Paraná, para evaluar la capacidad actual del ecosistema para depurar esos contaminantes.

1.5. Consideraciones

En vista de las concentraciones de antibióticos reportadas en ecosistemas acuáticos de otras regiones del mundo; los niveles de producción animal y uso asociado de antibióticos que se esperan en Argentina; las propiedades fisicoquímicas que determinan la distribución y el transporte ambiental de estos compuestos; los efectos sobre la biota acuática y especialmente sobre la microbiota, promoviendo el desarrollo de bacterias resistentes; y la falta de información regional acerca de la posible contaminación por antibióticos veterinarios en los sistemas acuáticos de la región pampeana, se proponen los objetivos del trabajo, que se presentan a continuación en el Capítulo 2.

Bibliografía

- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Agustina Etchegoyen, M., Marino, D.J., 2018. Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Sci. Total Environ.* 645, 89-96.
- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Capparelli, A.L., Marino, D.J.G., 2019. Behavior of ionophore antibiotics in aquatic environments in Argentina: The distribution on different scales in water courses and the role of wetlands in depuration. *Environ. Int.* 133, 105144.
- Andreozzi, R., Marotta, R., Paxéus, N., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*.
- aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2016. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 823-835.
- Awad, Y.M., Kim, S.C., Abd El-Azeem, S.A.M., Kim, K.H., Kim, K.R., Kim, K., Jeon, C., Lee, S.S., Ok, Y.S., 2014. Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. *Environ. Earth Sci.* 71, 1433-1440.
- Bartelt-Hunt, S., Snow, D.D., Damon-Powell, T., Miesbach, D., 2011. Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. *J. Contam. Hydrol.* 123, 94-103.
- Barzola, E.J., 2018. El modelo extractivo de agricultura y sus consecuencias ambientales en Argentina. *Revista de Ciencia y Técnica de la Universidad Empresarial Siglo 21*, 11,1.
- Bavera, G., Bocco, O., Beguet, H., Petryna, A., 2002. Cursos de Producción Bovina de Carne, F.A.V. UNRC. www.produccion-animal.com.ar.
- Boxall, A.B.A., 2012. New and Emerging Water Pollutants.
- Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., 2003. Antimicrobial growth promoters used in

- animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. Clin. Microbiol. Rev.
- Caballero Lajarín, C. ,2013. Sistemas de depuración de aguas residuales de origen ganadero. Humedales artificiales. (Tesis doctoral) Universidad Politécnica de Cartagena, Colombia.
- Celiz, M.D., Tso, J., Aga, D.S., 2009. Pharmaceutical metabolites in the environment: Analytical challenges and ecological risks. Environ. Toxicol. Chem.
- Chapman, H., Jeffers, T.K., Williams, R.B., 2010. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. Poult. Sci. 89, 1788-1801.
- Chee-Sanford, J.C., Aminov, R.I., Krapac, I.J., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I., 2001. Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities. Appl. Environ. Microbiol.
- Depetris, P.J. y Kempe, S., 1993. Carbon dynamics and sources in the Parana River. Limnol. Oceanogr. 38: 382-395.
- Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2005. LC-MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. TrAC - Trends Anal. Chem. 24, 645-657.
- Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action, en: Poultry Science.
- Dolliver, H., Gupta, S., 2008. Antibiotic Losses in Leaching and Surface Runoff from Manure-Amended Agricultural Land. J. Environ. Qual. 37, 1227-1237.
- Elorriaga, Y., Marino, D., Carriquiriborde, P., Ronco, A., 2012. Emerging pollutants: pharmaceuticals in the environment. Rev. Digit. Univ.
- Etchegoyen, M., Ronco, A., Almada, P., Abelando, M., Marino, D., 2017. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. Environ. Monit.

Assess. 189.

Etchegoyen, M.A., Ronco, A.E., Almada, P., Abelando, M., Marino, D.J.G., 2017. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. Environ. Monit. Assess. 189.

Fahrenfeld, N., Knowlton, K., Krometis, L.A., Hession, W.C., Xia, K., Lipscomb, E., Libuit, K., Green, B.L., Pruden, A., 2014. Effect of manure application on abundance of antibiotic resistance genes and their attenuation rates in soil: Field-scale mass balance approach. Environ. Sci. Technol.

FAO, 2018. Food Security and Nutrition in the World, IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing.

FAO., 2012. Organización de las Naciones Unidas para la alimentacion y la agricultura. Recuperado de <http://www.fao.org/argentina/es/>.

FAOSTAT, 2020. (2 de Febrero 2020). Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QA>

Ferreira, A.C.F., Almeida, C.M.R., Mucha, A.P., Santos, F., Basto, M.C.P., Lourinha, I., 2017. Can veterinary antibiotics affect constructed wetlands performance during treatment of livestock wastewater? Ecol. Eng. 102, 583-588.

Furtula, V., Farrell, E., Diarrassouba, F., Rempel, H., Pritchard, J., Diarra, M.S., *ra, S.A., 2010. Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of Escherichia coli isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials. Poult. Sci. 89, 180-8.

Furtula, V., Huang, L., Chambers, P.A., 2009. Determination of veterinary pharmaceuticals in poultry litter and soil by methanol extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes 44, 717-723.

- Halling-Sørensen, B., 2000. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*.
- Hammer, D.A., 1992. Designing constructed wetlands systems to treat agricultural nonpoint source pollution. *Ecol. Eng.* 1, 49-82.
- Hansen, M., Krogh, K.A., Björklund, E., Halling-Sørensen, B., Brandt, A., 2009a. Environmental risk assessment of ionophores. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 534-542.
- Hansen, M., Krogh, K.A., Brandt, A., Christensen, J.H., Halling-Sørensen, B., 2009b. Fate and antibacterial potency of anticoccidial drugs and their main abiotic degradation products. *Environ. Pollut.* 157, 474-480.
- Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Guerrero, C., 2007. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26, 466-485.
- Hilaire, S.S., Brady, J.A., Muir, J.P., Speshock, J., Bellows, B., 2020. Changes in Soil and Plant Microbial Community Populations Following Administration of Manure Containing Oxytetracycline or Monensin. *J. Soil Plant Biol.* 2019.
- Hillis, D.G., Lissemore, L., Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2007. Effects of monensin on zooplankton communities in aquatic microcosms. *Environ. Sci. Technol.*
- Homem, V., y Santos, L., 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *J. Environ. Manage.*
- Hussain, S.A., Prasher, S.O., Patel, R.M., 2012. Removal of ionophoric antibiotics in free water surface constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 41, 13–21.
- Iglesias, A.; Nebot, C.; Vázquez, B. I.; Miranda, J. M.; Abuín, C. M. F.; Cepeda, A., 2014. Detection of veterinary drug residues in surface waters collected nearby farming areas in Galicia, North of Spain. *Env. Sci Pollut Res*, 21, 2367-2377.

- Johnson, A.C.; Sumpter, J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ Sci Technol.*, 35, 4697-703.
- Kant, V., Singh, P., Verma, P.K., Bais, I., Parmar, M.S., Gopal, A., Gupta, V., 2013. Anticoccidial Drugs Used in the Poultry: An Overview. *Sci. Int.* 1, 261-265.
- Kant, V., Singh, P., Verma, P.K., Bais, I., Parmar, M.S., Gopal, A., Gupta, V., 2013. Anticoccidial Drugs Used in the Poultry: An Overview. *Sci. Int.* 1, 261-265.
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Rev. Ecological Indicators*, 8, 1-13.
- Kim, H.Y., Lee, M.J., Yu, S.H., Kim, S.D., 2012. The individual and population effects of tetracycline on *Daphnia magna* in multigenerational exposure. *Ecotoxicology*.
- Kim, S.C. y Carlson, K., 2006. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed. *Water Res.* 40, 2549-2560.
- Kumar, R.R., Lee, J.T., Cho, J.Y., 2012. Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55, 701-709.
- Kummerer, K., 2001. Introduction: Pharmaceuticals in the Environment, Pharmaceuticals in the Environment; Sources, Fate, Effects, and Risks.
- Kuppusamy, S., Kakarla, D., Venkateswarlu, K., Megharaj, M., Yoon, Y.E., Lee, Y.B., 2018. Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. *Agric. Ecosyst. Environ.* 257, 47-59.
- Landoni, M.F., Albarellos, G., 2015. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *Vet. J.*
- Lapworth D J, Baran, N, Stuart M E, and Ward R S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, 287-303.

- Lasanta Martínez, T., Errea Abad, M.P., 1997. Cambios recientes en las relaciones entre agricultura y ganadería extensiva: de la complementariedad a la dependencia de la ganadería. *Polígonos* 7, 47-75.
- Leguizamón, A., 2014. Modifying Argentina: GM soy and socio-environmental change. *Geoforum* 53, 149-160.
- Li, Y., Zhu, G., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. *Science of the Total Environment*, 468–469, 908–932.
- Lissemore, L., Hao, C., Yang, P., Sibley, P.K., Mabury, S., Solomon, K.R., 2006. An exposure assessment for selected pharmaceuticals within a watershed in Southern Ontario. *Chemosphere* 64, 717-729.
- Malato, S., Blanco, J., Vidal, A. Richter, C., 2002. Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: an overview. *Appl. Catal. B: Environ.*, 37, 1–15.
- Michelena, R., Eiza, M., Carfagno, P., 2013. Los suelos, la soja y la agriculturización. Inst. Nac. Tecnol. Agrícola (INTA). Inst. Suelos. CIRN INTA Castelar.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca 2020. (4 de enero de 2020). Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/agricultura-ganaderia-y-pesca>.
- Mostofa, K.M.G., Yoshioka, T., Mottaleb, A., 2012., *Photobiogeochemistry of organic matter: principles and practices in water environments*. Springer, New York.
- Nelieu, S., Perreau, F., Bonnemoy, F., Ollitrault, M., Azam, D., Lagadic, L., Bohatier, J., Einhorn, J., 2009. Sunlight nitrate-induced photodegradation of chlorotoluron: evidence of the process in aquatic mesocosms. *Environmental Science & Technology*, 43, 3148-3154.
- Niewold, T.A., 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth

promoters, the real mode of action? A hypothesis. Poult. Sci.

Novilla, M.N., 2018. Ionophores, Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition. Elsevier Inc.

O'Connor, S., Aga, D.S., 2007. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. TrAC - Trends Anal. Chem. 26, 456-465.

OIE. 2015. Organización Mundial de Sanidad Animal. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. Disponible en: goo.gl/3xSFMZ.

Park, S., Choi, K., 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. Ecotoxicology.

Peak, N., Knapp, C.W., Yang, R.K., Hanfelt, M.M., Smith, M.S., Aga, D.S., Graham, D.W., 2007. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. Environ. Microbiol.

Pei, R., Kim, S.C., Carlson, K., Pruden, A., 2006. Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). Water Res. 40, 2427-35.

Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. Environ. Pollut. 156, 61-66.

Pignatello, J.J., Katz, B.G., Li, H., 2010. Sources, Interactions, and Ecological Impacts of Organic Contaminants in Water, Soil, and Sediment: An Introduction to the Special Series. J. Environ. Qual.

Pordomingo, A.J., Galyean, M. E., Branine, M. E. y Freeman, A.S. 1999. Effects of daily and weekly rotations of lasalocid and monensin plus tylosin compared with continuous feeding of ionophores on ruminal fermentation. Rev. Arg. Prod. Anim. 19:362-382.

- Ramaswamy, J., Prasher, S.O., Patel, R.M., Hussain, S.A., Barrington, S.F., 2010. The effect of composting on the degradation of a veterinary pharmaceutical. *Bioresour. Technol.* 101, 2294–2299.
- Reboratti, C., 2010. Un mar de soja: La nueva agricultura en Argentina y sus consecuencias. *Rev. Geogr. Norte Gd.* 76, 63-76.
- Robinson, I., Junqua, G., Van Coillie, R., Thomas, O., 2007. Trends in the detection of pharmaceutical products, and their impact and mitigation in water and wastewater in North America. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1143-1151.
- Ronco, A.E., Marino, D.J.G., Abelando, M., Almada, P., Apartin, C.D., 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin : glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ. Monit. Assess.*
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725-759.
- Sassman, S.A. y Lee, L.S., 2005. Sorption of three tetracyclines by several soils: Assessing the role of pH and cation exchange. *Environ. Sci. Technol.* 39, 7452-9.
- Sassman, S.A. y Lee, L.S., 2007. Sorption and degradation in soils of veterinary ionophore antibiotics: Monensin and Lasalocid. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1614-1621.
- Silva, B.F. da, Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A.A., Petrovic, M., Barceló, D., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* 85, 1331-1339.
- Sim, C.H., Yusoff, M.K., Shutes, B., Ho, S.C., Mansor, M., 2008. Nutrient removal in a pilot and full scale constructed wetland, Putrajaya city, Malaysia. *J. Environ. Manage.* 88, 307–317.
- Sun, P., 2014. Transformation of Veterinary Antibiotics under conditions related to Water-

Soil-Litter Systems.

- Sun, P., Barmaz, D., Cabrera, M.L., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., 2013. Detection and quantification of ionophore antibiotics in runoff, soil and poultry litter. *J. Chromatogr. A* 1312, 10-17.
- Sun, P., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., 2016. Estimation of environmentally relevant chemical properties of veterinary ionophore antibiotics. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 18353-18361.
- Tao, R., Ying, G.G., Su, H.C., Zhou, H.W., Sidhu, J.P.S., 2010. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China. *Environ. Pollut.* 158,2101-9.
- Tasho, R.P., Cho, J.Y., 2016. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Sci. Total Environ.* 1;563-564:366-76.
- Thaxton, J.P., Dozier, W.A., Branton, S.L., Olanrewaju, H.A., Roush, W., Purswell, J.L., 2014. Stocking Density Effects on Male Broilers Grown to 1.8 Kilograms of Body Weight. *Poult. Sci.* 85, 344-351.
- Valdés, M.E., Amé, M.V., Bistoni, M. de los A., Wunderlin, D.A., 2014. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Sci. Total Environ.* 472:389-96
- Vasiliadou, I.A., Molina, R., Martínez, F., Melero, J.A., 2014. Experimental and modeling study on removal of pharmaceutically active compounds in rotating biological contactors. *J. Hazard. Mater.* 274,473-82.
- Viglizzo, E.F., Frank, F.C., Carreño, L. V., Jobbágy, E.G., Pereyra, H., Clatt, J., Pincén, D., Ricard, M.F., 2011. Ecological and environmental footprint of 50 years of agricultural expansion in Argentina. *Glob. Chang. Biol.*
- Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, K.O., 2000. Acute and chronic toxicity of

veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 40, 723-30.

Yoshida, N. M.; Moscuza, C. H.; Mortier, C. du; Castro, M. J. L. ; Cirelli, A. Fernández, 2005. Environmental change and rational water use.

Yoshida, N., Castro, M.J.L., Cirelli, A.F., 2010. Degradation of monensin on soils: Influence of organic matter and water content. *Chem. Ecol.*, 27-33.

Yoshida, N.M., Moscuza, C.H., Castro M.J.L., Fernández Cirelli, A, 2008. Effect of feedlot design and management on the fate and distribution of monensin. *Rev.Arg.de Prod. An.*,28, 1-112.

Zhao, L.; Dong, Y. H.; Wang, H., 2010. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of the Total Environment*, 408, p 1069-1075.

Zhou, L.J.; Ying, G.G.; Zhao, J.L.; Yang, J.F.; Wang, L.; Yang, B.; Liu, S. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. *Environmental pollution* 2011;159:1877-1885.

Žižek, S., Dobeic, M., Pintarič, Š., Zidar, P., Kobal, S., Vidrih, M., 2015. Degradation and dissipation of the veterinary ionophore lasalocid in manure and soil. *Chemosphere* 138, 947-951.

Capítulo 2 – Hipótesis y objetivos



2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

Los fármacos utilizados para mejorar el rendimiento productivo en la cría intensiva, tanto bovina como avícola, son movilizados por acciones antrópicas y naturales desde el suelo, hacia distintos compartimentos ambientales ingresando a cuerpos de agua de la región. Esta contaminación ambiental se minimiza utilizando tecnologías de tratamiento adecuadas, sobre los efluentes propios de cada establecimiento.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general.

Caracterizar el comportamiento ambiental de fármacos de uso corriente en la producción bovina y avícola, en ecosistemas representativos de la región pampeana. Entre los mismos se buscará determinar la dinámica de partición y distribución en los distintos compartimentos ambientales y estudiar distintas condiciones operativas dirigidas a favorecer su degradación en aguas, contribuyendo con información de base para el desarrollo de tecnologías de tratamiento.

2.2.2. Objetivos específicos.

- i. Optimizar metodologías de extracción y cuantificación de los compuestos seleccionados para el análisis químico, en las distintas matrices ambientales.

- ii. Identificar y caracterizar los compuestos farmacéuticos veterinarios de uso más frecuentes en la cría intensiva en corral y determinar sus niveles de concentración en aguas subterráneas y superficiales, suelos y sedimentos de fondo. Con este fin se seleccionaron sitios representativos de las provincias de Buenos aires y Entre Ríos. Estas regiones están incluidas en el marco de los proyectos PICT y PI dentro de los cuales se encuadrará el presente estudio.
- iii. Caracterizar posibles patrones estacionales y/o temporales estudiando las variaciones de concentración de compuestos representativos en los distintos compartimentos ambientales e Interpretar los resultados ambientales en función del tipo de actividad pecuaria, las dosis de aditivos farmacéuticos empleados, las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y las características del medio receptor.
- iv. Explorar variables de laboratorio destinadas a caracterizar y favorecer la degradación de los compuestos detectados en aguas, tal que puedan ser aplicadas en futuros sistemas de remoción a escala de campo, mediante la aplicación de procedimientos avanzados de oxidación que permitan el uso de radiación solar.
- v. Evaluar el rol del humedal del Delta del Paraná en la provincia de Entre Ríos, como sistema depurador natural para esta familia de compuestos estudiadas.

Capítulo 3 – Metodologías analíticas para detección de ionóforos y tetraciclinas



3. Metodologías analíticas para detección de ionóforos y tetraciclinas

3.1. Resumen del capítulo

En las siguientes secciones se presentarán las metodologías de análisis utilizadas para el estudio de las dos familias de antibióticos en distintas matrices ambientales. En función de los resultados obtenidos, tanto en lo que respecta a las bondades de las técnicas de extracción y análisis como de la frecuencia, niveles y relevancia de la información generada, el estudio de los ionóforos será presentado con mayor detalle.

3.2. Fármacos de estudio.

Se seleccionan como compuestos a estudiar cuatro antibióticos ionóforos (API): monensina, salinomicina, lasalocid y maduramicina, y tres fármacos de la familia de las tetraciclinas (TTC): tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina. Las propiedades de los fármacos elegidos se presentan en la Tabla 1 (Sección 1.2.2).

3.3. Metodologías de pretratamiento de muestras

3.3.1. Cromatografía líquida y espectrometría de masas

Las nociones de dinámica ambiental aplicadas a sustancias provenientes de industrias ampliamente desarrolladas como la farmacéutica, devino en la necesidad de analizar la potencial llegada de los más de cientos compuestos utilizados tanto en medicina humana como animal (Boxall, 2012). La detección de antibióticos en aguas, sedimentos y suelos atrajo particularmente una importante atención debido a la posibilidad de promover el desarrollo

de resistencia microbiana (por encima de sus efectos agudos), destacando la importancia del monitoreo de este tipo de compuestos en ambientes acuáticos a niveles sub-letales (efectos crónicos). Durante las últimas décadas, mucho esfuerzo se ha puesto en el desarrollo y puesta a punto de metodologías analíticas que permitan identificar y cuantificar trazas de antibióticos en matrices ambientales (p. ej. en el orden de los ng/L, para aguas), incluyendo desde la cromatografía de capa fina y screening por bioluminiscencia, hasta otros métodos de mayor sensibilidad (y así también costo) como HPLC, con detectores genéricos como Ultravioleta (UV), Fluorescencia (FL) y arreglo de diodos (DAD). Sin embargo, a pesar de poseer límites de detección aceptables, es consensuada la mejora significativa que poseen técnicas más avanzadas como la espectrometría de masas (LC-MS, LC-MS-MS), con mayor sensibilidad, y con la posibilidad de estudiar múltiples fragmentos de confirmación para las moléculas de interés (Goel, 2015) que favorecen la identificación y confirmación de los analitos estudiados versus los detectores convencionales. La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa se ha convertido en la técnica por excelencia de análisis de contaminantes emergentes en matrices ambientales debido a su capacidad de multi análisis, su sensibilidad y reproducibilidad (Boxall, 2012; Díaz-Cruz y Barceló, 2007, 2005; Kim et al., 2008). La técnica de LC-MS-MS se considera fundamental para el análisis de fármacos polares y sus metabolitos, y es especialmente apropiada para muestras ambientales debido a su selectividad. Los detectores de UV y FL requieren habitualmente el uso de agentes derivatizantes, y el UV no es lo suficiente sensible para el análisis de algunos compuestos. En el caso de los antibióticos polímeros ionóforos, al carecer de cromóforos es necesario el uso de FL sobre el derivado con Aldehído (Huet et al., 2013) y aun así no iguala la sensibilidad lograda por MS. Es importante notar que los sistemas de detección en tándem como LC-MS-MS aportan especificidad y sensibilidad en comparación a LC con UV/FL/DAD o incluso

sistemas de masas simples LC-MS, además de significar una importante reducción en el tiempo de preparación de la muestra consecuentemente en mejoras derivadas de menores pasos previos al análisis instrumental (Quattrocchi, 2019). El monitoreo de dos transiciones padre-hijo de los iones precursores es lo suficientemente específico para confirmar la presencia de compuestos trazas, alcanzando los requisitos de confirmación que proponen legislaciones internacionales como las propuestas por la Comunidad Europea (European Commission DG-SANTE, 2019)

Tal como se mencionó en secciones previas, en las etapas iniciales del presente trabajo se contaba con un equipo HPLC-MS, cuyos límites de detección y cuantificación pueden apreciarse en la Tabla 8. Las concentraciones de ionóforos en aguas y sedimentos reportadas en otros sitios, indican rangos que van desde las decenas o cientos de microgramos (por L o kg respectivamente) en zonas de mayor impacto hasta unos pocos nanogramos en sitios más alejados, o con menor influencia de actividad productiva animal (Bartelt-Hunt et al., 2011; Kim y Carlson, 2006; Lissemore et al., 2006). Esta información previa, en relación a los objetivos del presente trabajo (monitoreo en distintos tipos de ecosistemas acuáticos) impulsó la necesidad de contar con metodologías de extracción, concentración y limpieza o *clean-up* de los antibióticos desde las distintas matrices a estudiar, a fin de alcanzar niveles detectables conforme a los publicados en la literatura internacional. Teniendo en cuenta la importancia de estos compuestos en los sistemas productivos, se observa un esfuerzo, en las últimas décadas, en la investigación para el desarrollo de metodologías de *screening* rápidas, especialmente en lo relativo a aguas, así como más específicas para matrices como excretas vacunas o porcinas (Cha et al., 2005; Schlusener et al., 2003). Existe una gran diversidad de técnicas de complejidad variable, accesibilidad y costo para el análisis de fármacos

veterinarios, dentro de las que se destacan la extracción en fase sólida (para aguas) y la metodología *QuEChERS* (para sedimentos y matrices biológicas) (Broekaert et al., 2011; Clarke et al., 2013; Díaz-Cruz y Barceló, 2005, 2006; Hansen et al., 2009; Hernández et al., 2007a; Iglesias et al., 2012).

El estudio de la distribución de contaminantes en la columna de agua, resulta de gran interés en estudios ambientales, siendo el reparto entre la fracción soluble y el material particulado en suspensión un factor determinante de la movilidad ambiental. El estudio del material particulado suele necesitar de algunas consideraciones propias: para el caso de moléculas hidrofóbicas el reparto puede verse favorecido hacia esta matriz sólida; en combinación con las bajas masas de particulado en suspensión en las aguas naturales, el aporte a la masa de contaminantes a la columna de agua sea muchas veces despreciable en relación a la fase soluble; la variabilidad propia de los sistemas, en cuanto al contenido de partículas, con lo que es difícil establecer un Límite de detección regular para estos casos. En este sentido, muchos autores reportan la liofilización como pretratamiento de las muestras totales, y SPE como mecanismo de *clean-up* y concentración post-extracción (Darwano et al., 2014; Laabs et al., 2007; Zhang y Li, 2018) que solo contemplaría la fase soluble. Dados los objetivos del presente trabajo, la metodología utilizada se adaptó en función de las condiciones y herramientas presentes, con algunas limitantes especialmente en los pasos de *clean-up*/concentración.

En general, los sistemas cromatográficos para el análisis de contaminantes trazas requieren un paso previo de extracción y preconcentración de los analitos desde la matriz ambiental de estudio. Los métodos más reportados incluyen una SPE inicial seguida de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de cuadrupolo en tándem. Este sistema ha sido

ampliamente validado como un método robusto para la extracción y análisis de antibióticos de matrices ambientales (Hernández et al., 2007b; Iglesias et al., 2012; Kim y Carlson, 2006, 2005). Una de las complicaciones más comunes en estudios de compuestos traza en matrices complejas, es el llamado “efecto matriz”, también apodado como “*el talón de Aquiles*” de la espectrometría de masas (Taylor, 2005). Este efecto ocurre en la etapa de ESI, y hace referencia a la variación en la ionización de los analitos de interés, debido a la presencia de otros componentes de la matriz original que hayan co-eluido y puedan alterar la eficiencia del proceso como consecuencia de la exploración de moléculas que se encuentran en entornos químicos de componentes mayoritarios característicos (generalmente compuestos no volátiles que ocupan la superficie de las gotas antes de la transferencia a fase gaseosa). Por lo general este fenómeno implica una disminución en la capacidad de ionizar los analitos de interés, sin embargo, también se conocen efectos de exaltación de la señal (Hernández et al., 2007a; Taylor, 2005). La complejidad de las distintas matrices (p. ej. agua, suelo, tejidos vegetales, etc.) puede amplificar este efecto (Hernández et al., 2007a; Kang et al., 2013), aunque existen también otros factores, tal como la geometría de la fuente de ionización (Ghosh et al., 2012) que demandan estudios orientados a caracterizar y minimizar este fenómeno. Conocer este alcance permite articular la toma de decisiones acerca de cuanto esfuerzo requieren los pasos de extracción, *clean-up* y concentración previos.

Existen múltiples técnicas para evaluar el efecto matriz:

- Infusión post-columna
- Uso de estándares internos isotópicamente marcados
- Adición post-extracción

El primer caso resulta bastante engorroso, además de que requiere un gran volumen de extracto, que muchas veces resulta en pérdida de sensibilidad. Por otra parte, el uso de moléculas isotópicamente marcadas tiene grandes ventajas como la posibilidad de estudiar el efecto muestra a muestra, sin embargo, existen muy pocas moléculas disponibles en el mercado (ningún ionóforo).

El método más reportado para la determinación cuantitativa de este tipo de efectos, involucra el sobreagregado de analitos sobre extractos finales de muestras, y comparando la respuesta analítica frente a soluciones estándares puras preparadas en el solvente de trabajo (Taylor, 2005).

Tomando en consideración las nociones mencionadas, en las secciones siguientes se presentan las técnicas exploradas para las distintas matrices, a fines de probar metodologías prácticas que permitan dar con parámetros de especificidad, sensibilidad y aplicabilidad apropiados para el análisis de niveles ambientales de ionóforos y tetraciclinas.

3.4. Materiales

3.4.1. Instrumental

Los reactivos, sales y solventes, materiales y equipamientos utilizados a lo largo del presente trabajo se detallan en el Anexo I.

3.4.2. Reactivos

Todos los disolventes utilizados en los análisis químicos y cromatográficos fueron de grado de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y todas las sales de grado analítico (JT Baker-

Mallinckrodt Baker Inc., EE. UU.). Se usó un sistema de purificación de agua Sartorius Arium™ (Sartorius AG, Göttingen, Países Bajos) para obtener agua ultrapura. Los compuestos estudiados (ionóforos y tetraciclinas) fueron adquiridos en Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU con calidad analítica. Para el estudio individual de cada analito, se prepararon soluciones madres inicialmente en los solventes apropiados en cada caso (Tabla 4) a una concentración nominal de 1,00 mg/mL y luego se diluyeron para la preparación de las soluciones estándar de trabajo mixtas y de concentración variable.

Tabla 4. Pureza y solvente de preparación de las soluciones madres de cada analito.

ANALITO	PUREZA (%)	SOLVENTE DE PREPARACIÓN
Lasalocid	85	MeOH
Monensina	91	MeOH
Salinomicina	92,5	MeOH
Maduramicina	93,5	MeOH
Tetraciclina	99	ACN/Ácido Oxálico 30:70 + Solución. HCl 2N
Oxitetraciclina	89	Ácido Cítrico 1,5%
Clortetraciclina	97,1	MeOH + Solución. HCl 2N

3.4.3. Estabilidad de las soluciones

Se estudió la estabilidad semanal de las soluciones mixtas preparando 3 grupos de estándares de 50 µg/L según sus características: Ionóforos, Tetraciclinas y Mix, cada uno por duplicado y conservado en 2 tipos de materiales: vidrio y plástico (polipropileno). Tal como se observa en la Figura 3, en excepto para lasalocid y maduramicina, se observaron menores concentraciones al conservar en un mismo extracto ionóforos y tetraciclinas. Este efecto se ve fuertemente marcado para salinomicina y monensina, con pérdidas de hasta un 80% y 44% respectivamente. La degradación puede ser producto de la hidrólisis ácida de ambos compuestos, ya que las tetraciclinas se preparan en entornos de bajo pH (Sun et al., 2013b).

Para evitar dicho efecto, se decidió trabajar con los dos grupos de estándares por separado. En el caso de las tetraciclinas, además, se observa que en los grupos individuales también existe una disminución significativa de la señal, posiblemente debido a efectos de hidrólisis tal como se discutirá en secciones posteriores (Díaz-Cruz y Barceló, 2006). De esta manera, los estándares de dicha familia se prepararon al momento de la extracción/análisis de las muestras. Los ionóforos presentan mayor estabilidad, tal como se reporta en la literatura donde se ha demostrado que pueden mantenerse en MeOH a -20°C por tiempos superiores a 1 año (Zhang y Zhou, 2007). No se observaron diferencias significativas en los ionóforos respecto al uso de plástico o vidrio, mientras que, si hubo diferencias para las tetraciclinas, optando por conservar las mismas en plástico.

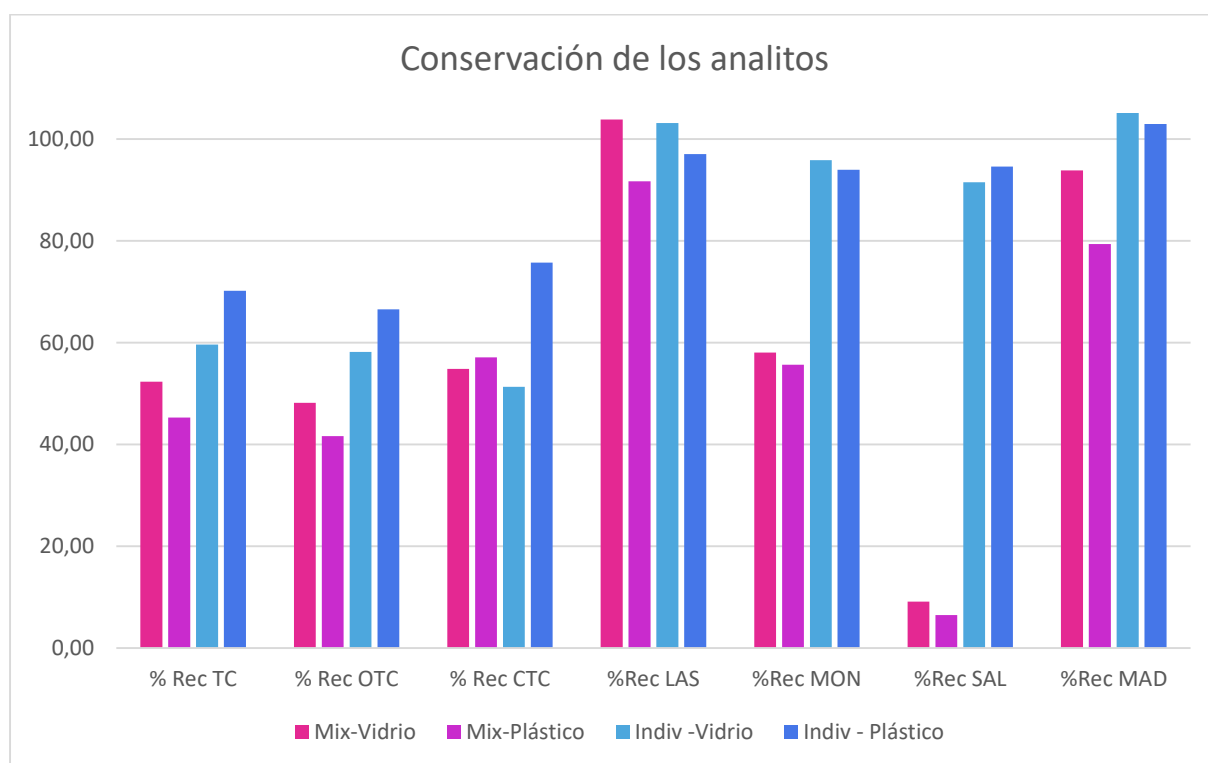


Figura 3. Conservación de los analitos en distintas mezclas y materiales del contenedor.

3.5. Parámetros de ionización para detección de ionóforos por HPLC-MS

La optimización inicial de los parámetros para la identificación de los compuestos de estudio en el MS se llevó a cabo mediante la inyección directa de soluciones estándares individuales. Una vez identificados los iones principales de cada compuesto, se preparó una solución mezcla conteniendo los 4 analitos, trabajando a una concentración de 10 mg/L en MeOH, a un flujo de 0.5 ml/min. Los análisis se realizaron en modo *SCAN* o barrido, en el cual se trabaja adquiriendo los datos totales de un rango de masas seleccionado, obteniendo información de todo el contenido de la muestra analizada. Como desventaja, se debe trabajar a altas concentraciones ya que tiene una baja sensibilidad, la cual aumenta al disminuir el rango de masas de trabajo.

Para la detección de los analitos, se utilizó una fuente de ionización por *electrospray* (ESI). El proceso inicia con el pasaje de la muestra por un capilar (o aguja) de nebulización, al que se le aplica un alto potencial eléctrico del orden de los kV. El líquido migra hacia un extremo del capilar formando un cono a la salida (llamado “cono de Taylor”) (Gross, 2011), el cual va disminuyendo su tamaño y concentrando una mayor densidad de carga en la superficie, hasta culminar en la formación de un aerosol, compuesto por pequeñas gotas altamente cargadas (aproximadamente 10 μm). Estas gotas siguen reduciendo su tamaño gracias a la evaporación de solvente, generalmente asistida por un gas de secado con temperatura (p. ej. N_2), y son atraídas hacia el capilar de ingreso del analizador. En el punto crítico donde las fuerzas electrostáticas en la gota superan las fuerzas cohesivas, ocurre una explosión coulombica, obteniéndose gotas cada vez más pequeñas (3-10 μm). A pesar de que existen algunas teorías que permitan explicar el proceso de ionización desde las gotas, no hay una completa aceptación por los modelos propuestos. De cualquier manera, el proceso termina en la

desorción de moléculas cargadas hacia la fase gaseosa, desde donde pueden moverse hacia el analizador. El proceso es proporcional a la concentración de analito. A pesar que los sistemas LC se utilizan a caudales del orden de 1 ml/min, para que el proceso de ionización sea efectivo es conveniente trabajar a flujos inferiores, reduciendo además la cantidad de solvente a evaporar y dándole más eficiencia al proceso. En ESI existen dos modos de trabajo: positivo y negativo, los cuales dependen de la polaridad del voltaje que se aplica en el capilar. En el presente trabajo, solo se testeó el modo ESI(+), siendo éste el más reportado para este tipo de compuestos en relación al modo negativo (Batt y Aga 2005; Kim y Carlson 2006; Kim y Carlson 2007; Tamtam et al., 2008). Además, hay autores que sostienen que el cambio de función puede resultar tanto en pérdida de sensibilidad, así como en la reducción de la vida útil del capilar de la fuente de ionización (Nebot et al., 2007). En modo positivo, además del ion molecular, la presencia de otras especies iónicas presentes puede dar lugar a la formación de aductos, siendo frecuentes los formados con Na^+ , K^+ , NH_4^+ , con utilidades importantes, como se discutirá posteriormente (Pomilio et al., 2011; Zhao y Lucas, 2015). Se testearon distintas condiciones de los parámetros de interés en el proceso de ionización para lograr la mayor cantidad de iones en la fuente. En la Figura 4 puede observarse como el aumento de la temperatura del gas de secado (de 300°C a 350°C) amplificó significativamente la señal de los analitos buscados. En estas condiciones, se favorecen los aductos con NH_4^+ respecto a los sódicos (m/z característicos = $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$). Por otra parte, un aumento en el voltaje del capilar (3000 eV a 3500 eV) se tradujo en mayores respuestas cromatográficas, optando por trabajar a 350°C y 3500 eV, como se puede observar en la Figura 5.

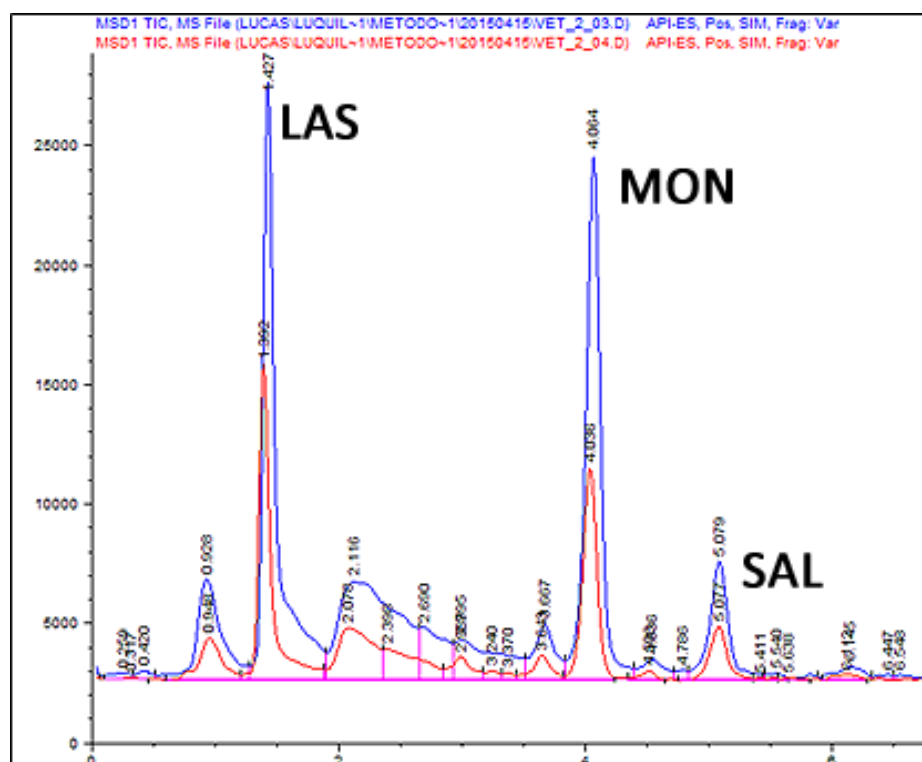


Figura 4. Comparación de corridas bajo dos condiciones de Temperatura de gas de secado. Azul: 300°C; Rojo: 350°C.

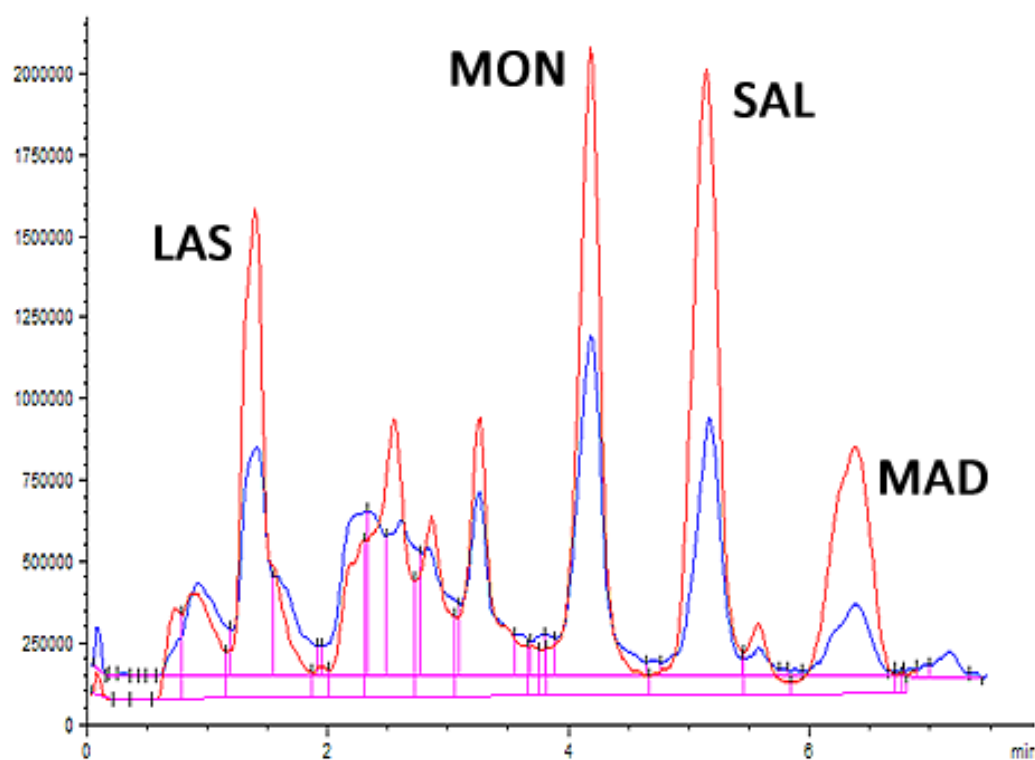


Figura 5. Comparación de corridas bajo distintas condiciones de voltaje de capilar en LC-MS. Azul: 3000 eV; Rojo: 3500 eV.

Los antibióticos poliéteres ionóforos se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilato y 2 ± 5 oxígenos éteres, que sirven de ligandos para la complejación de iones inorgánicos. En el caso de la monensina, se ha reportado que ambos isómeros (A y B) son afines a formar dicho complejo con sodio (m/z característicos = $[M+Na]^+$), ubicándolo en el centro de un octaedro distorsionado, coordinado por 6 átomos de oxígeno (Figura 6) (Lopes et al., 2002). Esta fuerte conformación quasi-cíclica que forman los aductos sódicos de ionóforos, crea limitaciones en el estudio de la fragmentación de los iones parentales protonados $[M+H]^+$, pudiendo éste detectarse únicamente en condiciones de bajo pH y alto potencial de cono, o en soluciones de exceso de éteres corona que compitan por el sodio presente (Lopes et al., 2001).

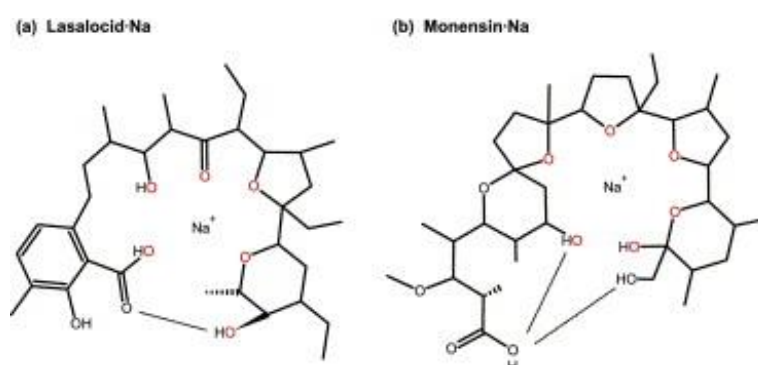


Figura 6. Conformación de los aductos sódicos de lasalocid (LAS) y monensina (MON).
Fuente: Volmer et al. (2005).

La estabilidad de los complejos metálicos presenta diferentes comportamientos según el compuesto o el metal. Comparando el caso de los metales alcalinos, esta estabilidad muestra una tendencia a aumentar positivamente en relación al radio catiónico, siendo máxima para los complejos con K^+ tanto para monensina como para lasalocid. Este comportamiento no se continúa en los casos de Rb y Cs, donde la estabilidad pasa a disminuir de manera inversamente proporcional, posiblemente debido al grado de coordinación que los ionóforos pueden alcanzar (Forbes et al., 2005). Este efecto es similar al conocido para éteres corona,

donde la especie más estable es aquella cuya geometría de la primera capa de coordinación se acerca más a la conformación de los átomos de O participantes (Lopes et al., 2006).

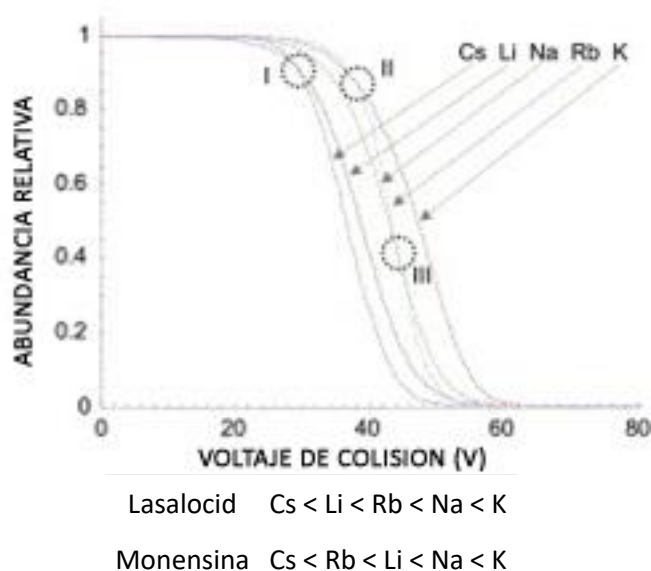


Figura 7. Abundancia relativa de los aductos de MON con distintos metales alcalinos en función del voltaje de colisión aplicado. Se observa la mayor estabilidad para el complejo con K^+ seguido por el de Na^+ para MON. Fuente: Forbes et al. (2005).

Además de los metales alcalinos, en el análisis de otros fármacos, se ha reportado también la formación de aductos con amonio, habitualmente utilizado como aditivo en la fase móvil. Este proceso, que ocurre durante la ionización, se ha visto que disminuye la sensibilidad de la detección de sulfonamidas (Díaz-Cruz y Barceló, 2006). Sin embargo, en otros casos como los ionóforos, la formación de dicho complejo ha sido estudiada ya que favorecen mecanismos de fragmentación adicionales que permiten estudiar transiciones alternativas de masas por ampliar las posibilidades de obtener iones precursores (con H^+ , Na^+ y NH_4^+). Además, al igual que con los complejos de metales alcalinos, la formación de aductos tan estables permite un aumento significativo de la sensibilidad a la detección de los iones precursores, aportando mayor especificidad a la hora de trabajar en modo SIM (Biswas et al., 2012; Forbes et al., 2005). Por lo mencionado anteriormente, se realizaron pruebas de corridas cromatográficas

con NH_4^+ y Na^+ como dopante en la fase móvil. Se comprobó que comparando las respuestas de soluciones mezclas de estándares de los 4 analitos en ausencia y presencia de los dopantes, el agregado de Na^+ y NH_4^+ mejora significativamente la detección/respuesta de los ionóforos. El exceso de dopantes evita la posibilidad de complejación con otras posibles impurezas posibles. Para potenciar dicho efecto, el Na^+ se incorporó a través de una sal de EDTA, el cual tiene la capacidad de complejar y barrer cationes polivalentes que puedan interferir en la formación de los aductos buscados (Liu et al., 2005). Se estudió la vía de incorporación de Na^+ al sistema a distintos niveles de concentración en la fase móvil. Se observaron problemas en la simetría de los picos a una concentración de 10 mM posiblemente a causa de saturar el proceso de ionización. Se obtuvieron mejores resultados a concentraciones inferiores a 5 mM, sin embargo, el mayor efecto se observó al incorporar una solución de Na_2EDTA 5 mM directamente sobre las muestras en momentos previos a la inyección (vial cromatográfico), disminuyendo drásticamente la cantidad de iones dopantes adicionales en circulación. Además de presentar ventajas cromatográficas/analíticas, esta modificación permitió evitar el depósito externo, en el cono de ionización, por excesos de sales en la etapa de generación de la nebulización y evaporación del solvente. En la Figura 8 se muestran los espectros de masas de lasalocid, monensina y salinomicina en 3 condiciones de corridas con NH_4^+ y distintos dopantes y/o fases. Se observa un comportamiento de baja fragmentación, consistente con lo reportado por otros autores (Miao et al., 2003; Volmer y Lock, 1998), obteniendo una mayor diversidad de fragmentos en las condiciones de exceso de Na^+ . Los resultados obtenidos se diferencian de los reportado por otros estudios que indican que el ion m/z 421 se presenta en presencia de amonio y no de sodio (Lopes et al., 2002; Volmer y Lock, 1998). Si bien el aducto $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$ demostró una fuerte tendencia a formarse, se conoce

que las transiciones derivadas son menos estables dado que se basan en enlaces de tipo puente de hidrógeno entre los oxígenos éteres y el NH_4^+ (Kiehl et al., 1998).

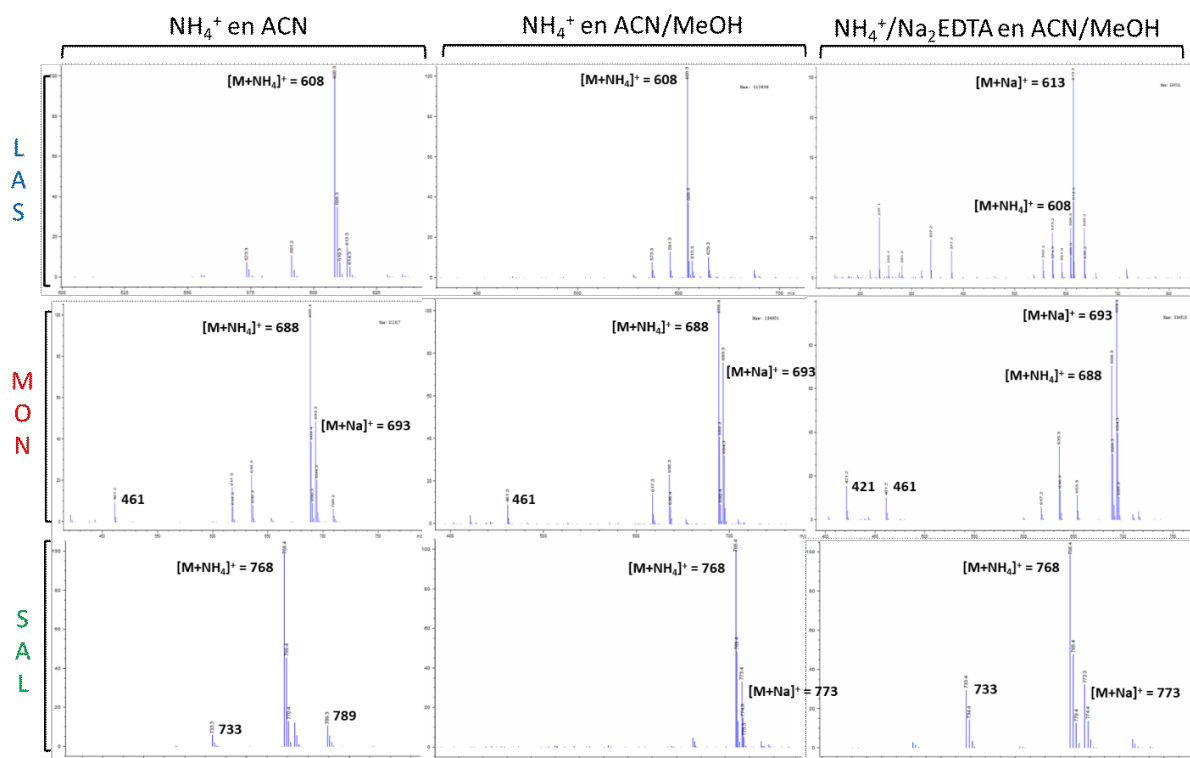


Figura 8. Efecto en el uso de dopantes y solventes en los espectros de masas de lasalocid, monensina y salinomicina (respectivamente).

En el caso de lasalocid, se destaca el aducto con NH_4^+ como precursor prevalente por sobre el sódico (Volmer y Lock, 1998). De esta manera, a diferencia de lo expuesto por Forbes (Forbes et al., 2005), la incorporación de amonio en la fase móvil resulto ventajosa para la detección de algunas transiciones de interés. Por otra parte, el uso de ácido fórmico en la fase móvil permitió mejorar la forma de los picos cromatográficos debido a que es capaz de protonar moléculas básicas, generando un aumento de señal tal como se ha reportado para técnicas ESI(+) (Petrovic y Barceló, 2007) y consecuentemente su sensibilidad en consonancia con lo mencionado por varios autores (Kim y Carlson, 2006; Zhao et al., 2018). Además, las condiciones de bajo pH favorecen que el grupo carboxilo terminal se mantenga protonado y

favorezca la interacción hidrofóbica con la columna de C₁₈. Esto evita la formación de aductos con más de un metal y favorece la obtención de espectros más limpios, ya que se conoce que dicho tipo de complejos (p. ej. especies disódicas) siguen otras rutas de fragmentación de menor intensidad a partir de rupturas en el grupo carboxílico terminal (Díaz-Cruz y Barceló, 2006; Hernández et al., 2007a; Volmer y Lock, 1998).

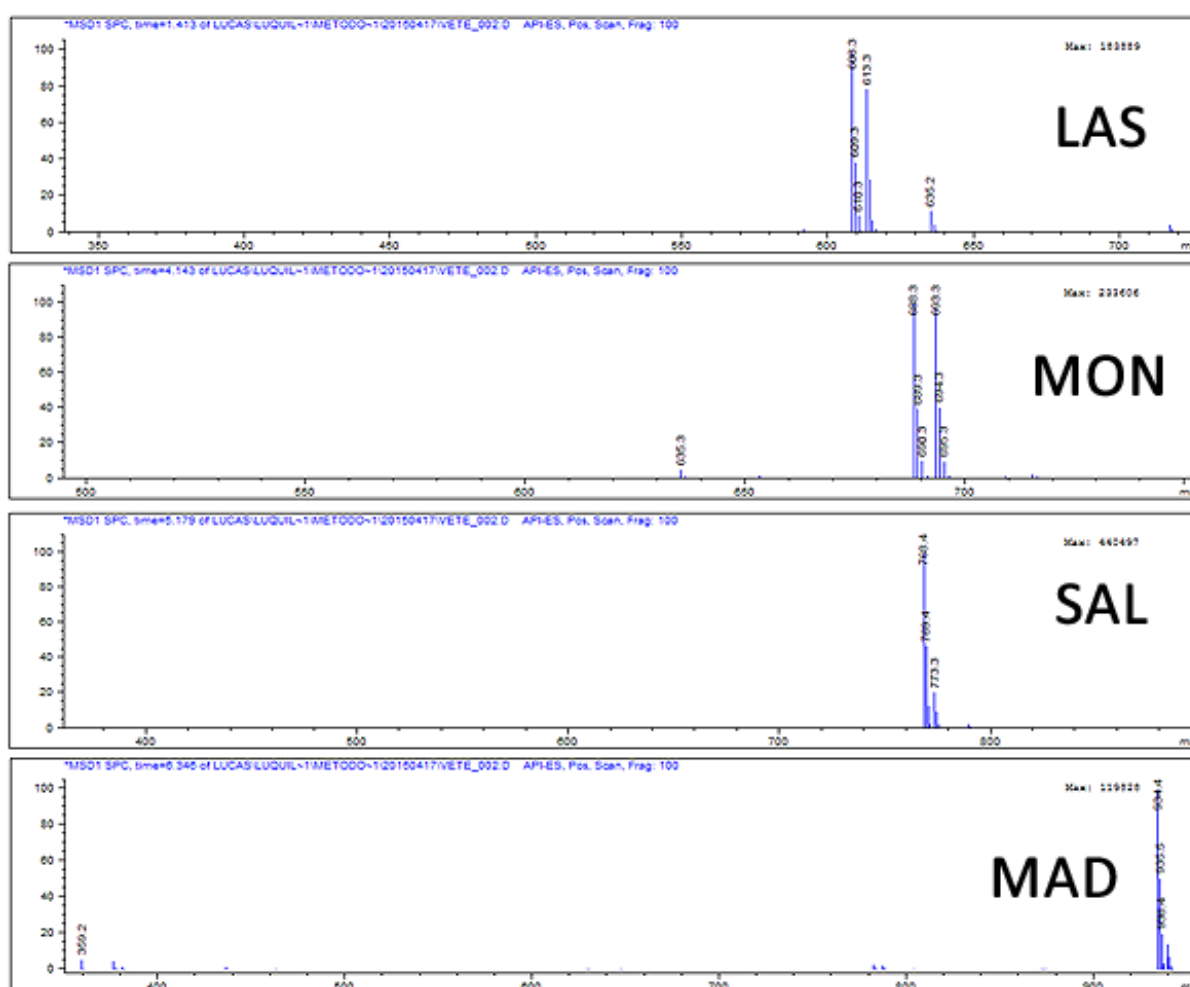


Figura 9. Espectro de masas en las condiciones de baja energía de fragmentación (100 eV). De arriba hacia abajo: LAS, MON, SAL, MAD.

3.5.1. Fragmentación

La modificación del voltaje del cono tiene 3 funciones específicas: la extracción de los iones desde la zona de presión atmosférica de la fuente hacia la zona de vacío del analizador; la

inducción de la fragmentación de los analitos, y la deshidratación de iones de gran tamaño a través de la ruptura de los clústeres con el objetivo de reducir su masa. Este parámetro afecta la fragmentación de cada analito (Manisali et al., 2006). Aporta información estructural, fragmentando en la fuente. Un aumento del voltaje implica una aceleración de los iones, provocando mayores colisiones con las especies gaseosas (gas de colisión). No es selectivo, pero puede usarse para generar ciertos iones, en particular para obtener iones pseudomoleculares de un compuesto. Típicamente para ESI: 10 a 60 V. Este parámetro puede ajustarse de manera individual, seleccionando las condiciones óptimas para cada uno. Se observaron distintos comportamientos al aumentar el voltaje aplicado. Las rupturas mayoritarias de los ionóforos comienzan a detectarse al superar los 15 V, siendo maduramicina el ionóforo más lábil. Para el caso de lasalocid, se observa una fragmentación dominada por el ion m/z 377 a los 25 V, aumentando drásticamente a los 35 V (y perdiendo la señal del ion precursor mayoritario). Por el contrario, las rupturas de salinomicina comienzan a observarse a los 30 V. Finalmente, las condiciones elegidas fueron: lasalocid y monensina: 300eV; salinomicina: 350eV; maduramicina: 150eV.

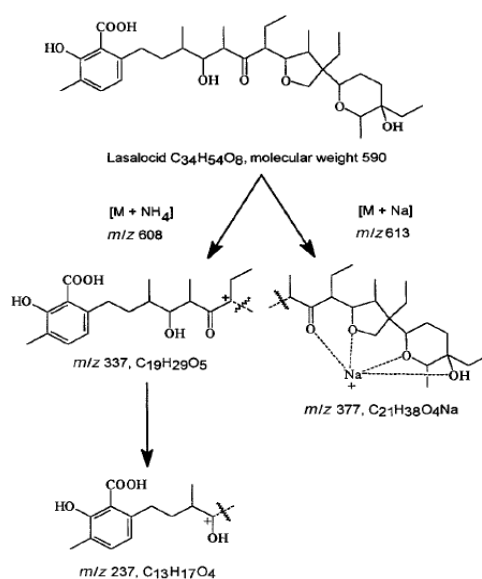


Figura 10. Fragmentaciones mayoritarias de lasalocid. Tomado de Harris et al. (1998).

Para monensina se observan los iones parentales m/z 688 y 693 (aductos con NH_4^+ y Na^+ respectivamente), los fragmentos m/z 635, 617 (pérdida de agua/s y amonio) y 461 frecuentes en todas condiciones, y es notable la aparición de los iones m/z 653 ($[\text{M}+\text{Na}^+-\text{H}_2\text{O}]$) y 421, únicamente en el tratamiento con Na^+ , los cuales no se encuentran en los tratamientos que solo poseen NH_4^+ tal como reportan (Harris et al., 1998; Kiehl et al., 1998; Lopes et al., 2002). Según los estudios realizados por Lopes et al. (2002), el autor propone que la vía preferencial depende del sitio donde ocurra la protonación, siendo las posibilidades la función ácida o el O-4, y en general, presentando fragmentos que conservan el núcleo de la subunidad poliéter (Figura 16). Dados los espectros analizados en el presente trabajo, la presencia del ion 461 indicaría que la vía 2 es preferencial en las condiciones estudiadas, la cual comprende un mecanismo de fragmentación de tipo Grob-Wharton (Figura 16), sumado a pérdidas de agua y CO. En la fragmentación de los ionóforos, es característico observar la pérdida de varias moléculas de agua. Estudios de la fragmentación a bajas energías de colisión de la monensina sódica (para ambos isómeros A y B), indica solo pérdidas menores de agua (m/z 675 y 661, respectivamente). Esta relativamente alta estabilidad de los aductos sódicos hace que se necesiten energías muy superiores a la energía umbral de fragmentación para poder obtener una serie completa de fragmentos (Lopes et al., 2002). Por estos motivos, si bien se buscaron las transiciones más reportadas para cada analito, debido a que en LC-MS no se puede trabajar midiendo fragmentos específicos sin afectar los iones precursores (un aumento en las condiciones de fragmentación afecta a todos los iones por igual), las condiciones preferentes fueron aquellas donde se favorece la presencia de los aductos $[\text{M}+\text{Na}^+]$ y $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$ y en los casos posibles, al menos un fragmento mayoritario.

Tabla 5. Iones precursores y transiciones buscadas para cada analito por LC-MS.

Molécula	E fragmentación (eV)	Precursor 1	Precursor 2	Fragmento
Lasalocid	250	613	608	377 *
Monensina	150	693	688	461
Salinomicina	350	773	768	431 *
Maduramicina	150	939	934	877 *

* No detectadas frecuentemente.

Una vez determinadas las transiciones a estudiar y los parámetros adecuados para cada analito, se modificó el sistema de trabajo a modo SIM (*Single Ion Monitoring*), el cual permite un seguimiento selectivo de los iones buscados. Posee mayor reproducibilidad y una sensibilidad de varios órdenes de magnitud superior al método SCAN al sesgar las masas analizadas (Zhao y Lucas, 2015). Otra ventaja que posee este modo, es la posibilidad de aumentar la sensibilidad de cada ion mediante la separación del análisis en canales instrumentales de monitoreo independientes programadas por tiempo. Esto se pudo realizar debido a la buena resolución obtenida entre los picos, con más de 1 minuto de diferencia entre los tiempos de retención. En el método propuesto, se optimizaron 3 ventanas de monitoreo individuales, excepto la última en la que se analizaron salinomicina y maduramicina en conjunto debido a la elución casi simultánea de ambos analitos.

3.6. Parámetros cromatográficos para la separación de antibióticos en un sistema HPLC-MS

3.6.1. Caudal

Trabajar a menor caudal (0.5 mL/min a 0.3 mL/min) mejora la sensibilidad del análisis. La dilución de la muestra se minimiza en el volumen de elución de fase móvil y en el trayecto de la columna disminuye la trayectoria transversal, lo cual se traduce en un aumento de

sensibilidad. Considerando el tipo de muestras a analizar en este trabajo, se optó por mantener el caudal fijo a 0.5 mL/min, para evitar efectos de envenenamiento de la columna.

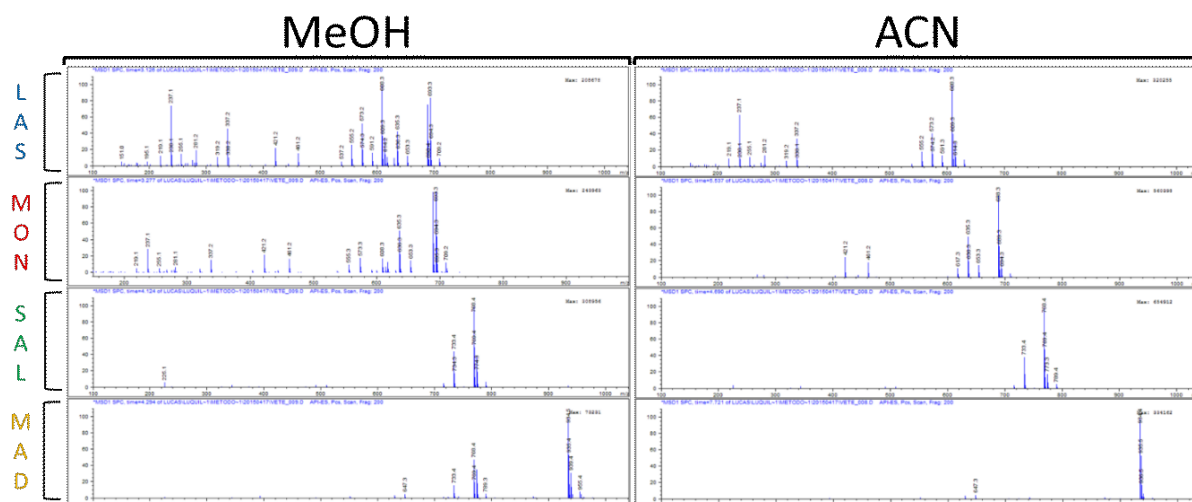


Figura 11. Espectros de masa de MeOH y ACN.

3.6.2. Solvente

Según la Figura 11, en general, los espectros de los ionóforos estudiados presentan menos “ruido de fondo” al utilizar ACN en la fase móvil. En términos cromatográficos se observa mejor resolución, pero menor señal para cada analito. Por otra parte, el uso de MeOH favorece fuertemente el aducto sódico (Figura 11), de elevada sensibilidad, y se observan ciertas transiciones útiles para la confirmación de estos compuestos. En cuanto a la cromatografía, se reduce el tiempo de análisis a costa de una disminución en la resolución de los picos. Para lograr un efecto intermedio, se optó por una mezcla MeOH/ACN 50:50, que favorece la señal y la resolución cromatográfica de los compuestos. La composición final se completa con el agregado de ácido fórmico al 0,1%, cuyas ventajas se discutieron anteriormente en la presente sección.

3.6.3. Inyección

Es conocida la influencia del entorno químico-tipo de solvente- de ingreso de los analitos al sistema cromatográfico sobre la simetría y respuesta de los analitos (Quattrocchi, 2019). Para ello se comparó el uso de MeOH y MeOH/H₂O 50:50 como solvente de reconstitución. La disminución en la fuerza eluotrópica del solvente mediante el agregado de agua mejoró la retención de los analitos en la fase estacionaria de la columna (factor k), observándose picos de mejor simetría (Quattrocchi, 2019). El volumen de inyección se ajustó mediante el uso de un bucle de inyección (*loop*) de 20 µL.

3.6.4. Columna

Tomando como referencia los parámetros cromatográficos típicos como el tiempo de retención, la resolución y simetría de picos, se testearon columnas de C₁₈ (Hansen et al., 2009) de distintas marcas y dimensiones externas y tamaño de partícula. La columna que mejor respondió a estos parámetros fue la XSelect CSH C₁₈ (75mm de largo, 4,6 mm de diámetro y tamaño de partículas de 3,5 µm). Este resultado fue muy importante ya que para la adaptación de la metodología a UHPLC, se recurrió a una columna con el mismo soporte sólido y del mismo fabricante, pero de tamaño de partículas de 1,7 µm adecuada para las condiciones de alta presión requeridas en dicho sistema.

Tabla 6. Energías de fragmentación (eV) aplicadas a cada analito, iones precursores analizados y fragmentos mayoritarios

Molécula	E fragmentación (eV)	Ión Precursor	Fragmento
Lasalocid	250	613	377
Monensina	150	693	461
Salinomicina	350	773	431
Maduramicina	150	939	877

Considerando todos los puntos anteriormente descritos tanto a condiciones propias de la cromatografía como columnas, fase móvil y caudal, así como su acople al sistema de espectrometría de masas simple y la sintonía del mismo para la detección programada de los ionóforos en modo de alta sensibilidad o SIM, el cromatograma de iones totales (TIC) obtenido para los analitos de interés se muestran en la Figura 12 siendo esta la metodología aplicada a las muestras en estudio.

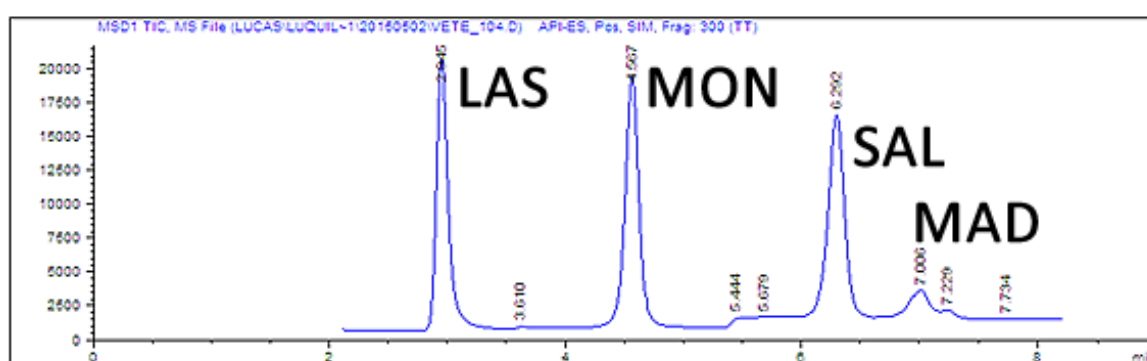


Figura 12. Cronograma típico para ionóforos por LC-MS.

3.7.Comparación HPLC-MS – UHPLC-MS/MS

En función de la identificación de los pasos críticos y comportamiento de los analitos estudiados en los sistemas de cromatografía líquida convencional HPLC-MS, se trabajó a posteriori en la adaptación, adecuación y aplicación del método obtenido a un equipo UHPLC con detección por espectrómetros de masas en tándem de cuadrupolos (UHPLC-MS/MS). Como se mencionó anteriormente, este tipo de equipamiento presenta sendas ventajas para el análisis de contaminantes, tanto por su selectividad/especificidad en la detección, gracias al complemento del segundo cuadrupolo, así como un aumento en la sensibilidad que optimiza el análisis de compuestos traza, adicionalmente el trabajo por transiciones de masas por sobre el de monitoreo múltiple de iones simple asegura la identidad molecular (STANTE,

2015). Por otra parte, el trabajo con partículas más finas, si bien tiene como consecuencia elevadas presiones en el módulo cromatográfico y demanda equipos de bombeo específicos, acorta los tiempos de corrida de manera significativa sin perder superficie cromatográfica específica (Quattrocchi, 2019), acortando los tiempos de trabajo y disminuyendo el uso de solventes orgánicos, siendo una técnica más amigable desde el punto de vista ambiental.

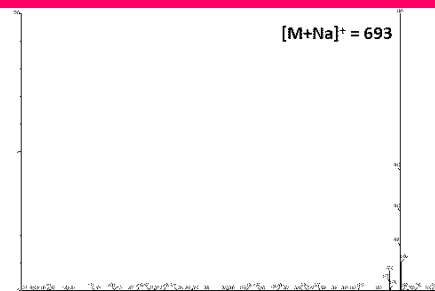
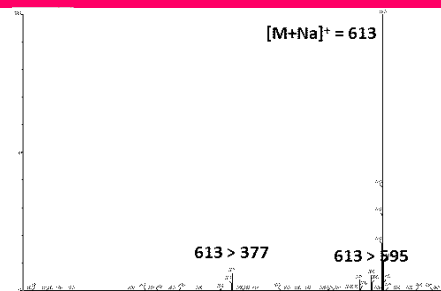


Figura 13. UHPLC-MS/MS.

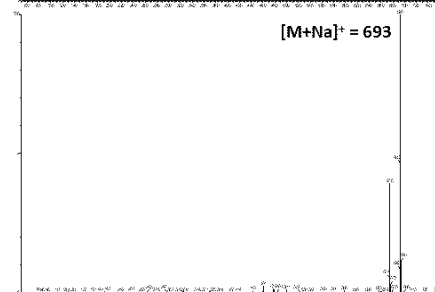
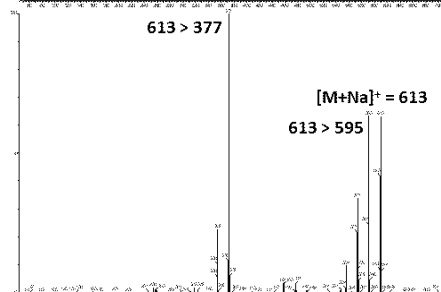
3.7.1. Transiciones detectadas

Para la adaptación del método, se trabajó estudiando los procesos de ionización y fragmentación en el nuevo sistema, en modo positivo (+). Para ello se evaluaron condiciones cromatográficas equivalentes (mismas fases móviles, dopantes y solvente de reconstitución de muestras), lo primero que se observó es la drástica disminución de aductos $[M+NH_4]^+$, incluso para lasalocid. Existen múltiples causas asociadas a esta variación, entre ellas la geometría de la fuente de ionización, que en el caso del equipo utilizado posee un diseño de Z, conocido y patentado por Waters® como Z-Spray (Ghosh et al., 2012; Manisali et al., 2006). En contraparte, se observó un aumento de la abundancia del aducto $[M+Na]^+$ para todos los ionóforos. Para el estudio de la fragmentación (“*Daughters*”) en las nuevas condiciones, se trabajó en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) que demanda la exploración del comportamiento de la colisión sobre los iones moleculares “padres” para evaluar los fragmentos por “CID: *collision induced dissociation*”. Durante este proceso, se seleccionan iones precursores (padres) con m/z específicos para cada analito en el primer cuadrupolo, los cuales luego se aceleran mediante potenciales eléctricos e ingresan a una cámara de colisión. Una vez allí, colisionan con gas Argón bajo distintas energías generando fragmentos, los cuales ingresan al segundo cuadrupolo para dar un nuevo espectro de masas. Dado que el aducto con amoníaco dejó de tener relevancia, se decidió eliminar el amonio en la fase móvil, buscando así aumentar la sensibilidad del aducto sódico y una vez definidos los aductos $[M+Na]^+$ como iones precursores mayoritarios, estudiar las rupturas más abundantes de los mismos. La eliminación del amonio además puede contribuir en mejorar la simetría de los picos, ya que se conoce que el mismo puede provocar un efecto de “*tailing*” sobre los mismos (Quattrocchi, 2019).

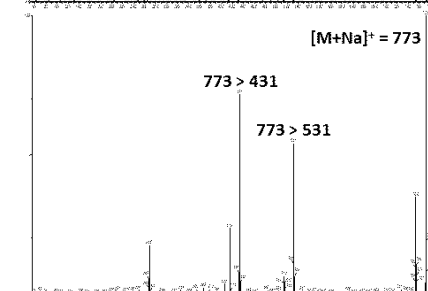
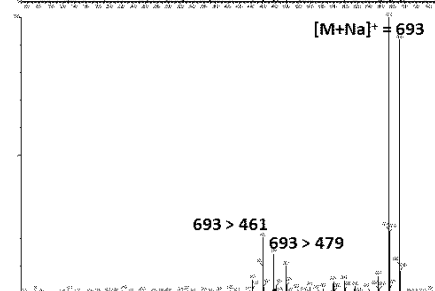
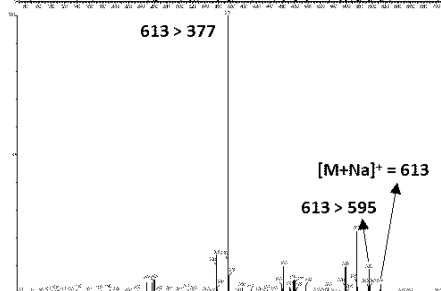
20V



30V



40V



50V

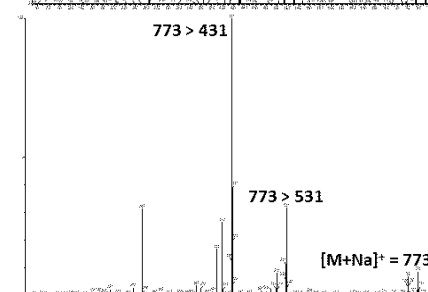
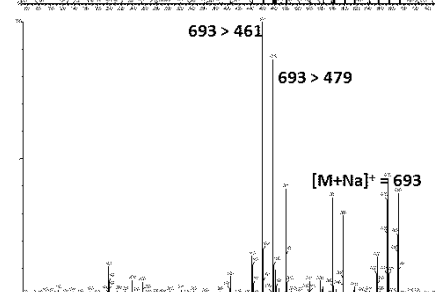
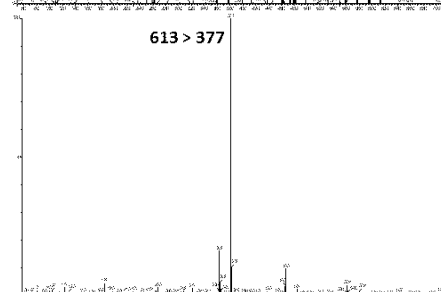


Figura 14. Espectros de masa de tres de los ionóforos estudiados bajo distintas condiciones de energía de colisión. Se observa un comportamiento individual de cada ionóforo respecto a dicho parámetro, lo cual se puede observar en la abundancia de los fragmentos respecto a los iones precursores en los distintos escenarios estudiados.

En la Figura 14 se pueden observar los espectros para lasalocid, monensina y salinomicina para distintas energías exploradas en la celda de colisión-CID. Se puede observar cómo lasalocid demuestra una mayor labilidad, tal que a los 40V ya no se observa el precursor, mientras que para monensina aún se observa el mismo después de los 50V. Este estudio de la fragmentación específica de cada precursor ha sido utilizado en combinación con otros detectores como FIT-QR para la determinación de mecanismos de rupturas de estos compuestos. En la Figura 15 se puede observar el espectro de monensina para un estándar de 1 mg/L bajo una energía de colisión de 55V. Muchos de los fragmentos obtenidos, corresponden con los mecanismos ya reportados (Forbes et al., 2005; Harris et al., 1998; Lopes et al., 2002), tal como se observa en la Figura 15.

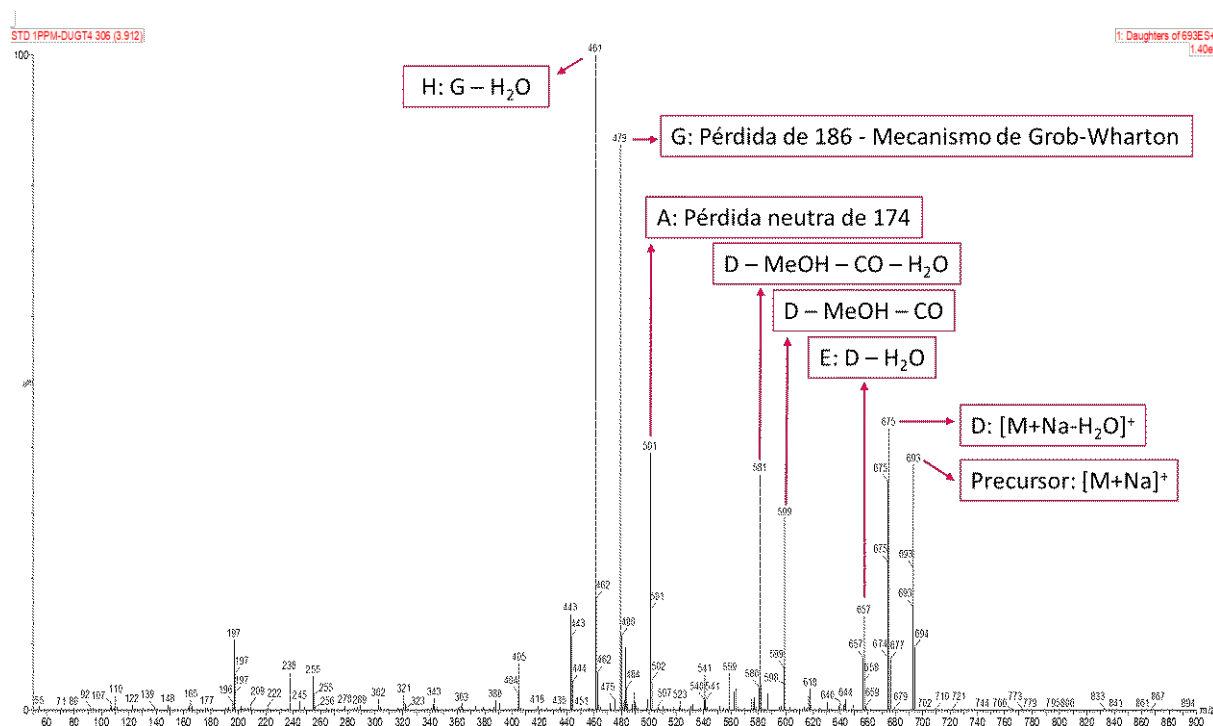


Figura 15. Espectro obtenido para monensina para una energía de colisión de 55 V. En los recuadros se observan los iones o pérdidas observadas, y las letras indican la referencia a la Figura 16.

A partir del estudio realizado, se obtuvieron las condiciones óptimas para cada analito, estudiando 2 o hasta 3 transiciones específicas en cada caso (Tabla 7), además del aducto precursor. Las transiciones elegidas concuerdan con lo reportado en la literatura (Broekaert et al., 2011; Clarke et al., 2014; Stubbings y Bigwood, 2009). Estos resultados muestran la especificidad de estas moléculas y aportan una mayor seguridad al momento de la confirmación de cada molécula, adecuándose por ejemplo a normativas como la SANTE de la Comunidad Europea (European Commission DG-SANTE, 2019). Si bien estas normativas se plantean para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos, ante la falta de normativa específica para fármacos en muestras ambientales, se puede considerar un parámetro de referencia en cuanto a la calidad mínima requerida para análisis de contaminantes trazas utilizando espectrometría de masas. En tal sentido, además de las reacciones o transiciones específicas caracterizadas y programadas, para la confirmación de los analitos en las muestras analizadas, se consideraron parámetros de confirmación en cada caso el tiempo de retención y el cociente característico entre las transiciones mayoritarias.

Tabla 7. Transiciones estudiadas para cada ionóforo y las condiciones de energía óptimas para su detección.

Analito	Ion Precursor	m/z	Transiciones estudiadas	Voltaje de cono (V)	Energía de la celda de colisión (V)
LAS	[M+Na] ⁺	613,40	613,40 > 376,90	25,0	40,0
			613,40 > 595,90	25,0	30,0
MON	[M+Na] ⁺	693,40	693,40 > 460,90	30,0	55,0
			693,40 > 478,90	30,0	55,0
			693,40 > 475,90	30,0	40,0
SAL	[M+Na] ⁺	773,40	773,40 > 430,90	25,0	40,0
			773,40 > 531,10	25,0	50,0
MAD	[M+Na] ⁺	939,40	939,70 > 877,70	30,0	40,0
			939,70 > 939,70	30,0	10,0

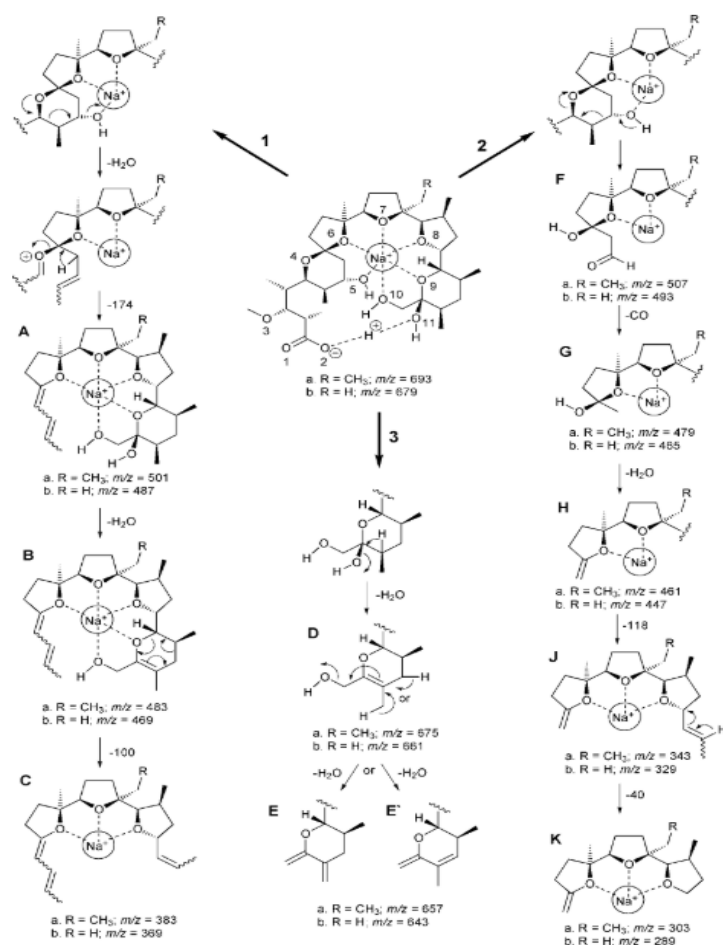


Figura 16. Vías principales de fragmentación para monensina. Se destaca la vía 2 como la más representativa en función de los resultados de este trabajo. Tomado de Lopes et al. (2002).

3.8. Parámetros de calidad del método

3.8.1. Sensibilidad y límites de detección y cuantificación instrumentales

El límite de detección (LOD) se define como la concentración mínima residual que puede identificarse (en función de parámetros tal como el tiempo de retención, transiciones). Por otra parte, el límite de cuantificación (LOQ) hace referencia a la concentración (o masa) mínima que puede validarse con una precisión aceptable al aplicar el método analítico y los criterios de confirmación (European Commission DG-SANTE, 2019). Existen distintos métodos para su determinación: un método basado en la curva de calibración (relación entre la desviación estándar de la ordenada y la pendiente); un método mucho más conservador

propuesto por IUPAC; y finalmente un método basado en la relación señal/ruido (S/N). Este último suele ser de los más utilizados al trabajar con sistemas de alta complejidad debido a las rigurosidades en los demás parámetros de confirmación y a la realidad de respuesta del instrumento utilizado para las matrices sometidas a análisis (Broekaert et al., 2011).

Para la determinación de los LOD y LOC, se busca una concentración de analito que genere una señal 3 y 10 veces por encima del ruido, respectivamente (Iglesias et al., 2012). Estos valores pueden obtenerse trabajando a concentraciones en el rango de los límites. En algunos softwares de post-data análisis, como MassLinx 4.1 (Waters®), el parámetro S/N (*signal to noise*) puede obtenerse de manera automática. En la Tabla 8 se pueden observar los LOD y LOC para ambos detectores, destacándose la disminución de un orden de magnitud en ambos parámetros al utilizar MS-MS respecto a la técnica de un solo cuadrupolo MS. Tal como se discutió anteriormente, el trabajo independiente de los dos cuadrupolos, aporta ventajas en el estudio de compuestos a nivel traza, alcanzando valores del orden de las sub-ppb. (Iglesias et al., 2012).

Durante los ensayos de extracción, la recuperación de Maduramicina fue muy baja en todas las matrices ensayadas (variando entre la detección por debajo del LCM y un 10% máximo). Por tal razón, se separó del resto de los ionóforos, de manera de aumentar la sensibilidad respecto a estos analitos que sí presentaban extracciones eficientes.

Tabla 8. Límites de detección y cuantificación instrumentales para cada uno de los instrumentales analíticos utilizados.

Parámetro	Sistema	LAS	MON	SAL	MAD
LOD	HPLC – MS	0,7	0,5	0,7	2,0
	UHPLC – MS/MS	0,03	0,02	0,03	0,09
LOC	HPLC – MS	2,0	1,0	1,5	5,0
	UHPLC – MS/MS	0,11	0,08	0,09	0,30

3.8.1. Repetibilidad

Otro parámetro analizado fue la repetibilidad de las inyecciones, trabajando a 3 concentraciones. Se observa un mayor desvío para la concentración de 1 µg/L (Tabla 9). Todos los coeficientes de variación se encuentran por debajo del 20% recomendado por SANTE (European Commission DG-SANTE, 2019).

Tabla 9. Repetibilidad de las inyecciones de ionóforos a 3 niveles de concentración. Se presentan los coeficientes de variación obtenidos para cada tratamiento.

Analito	n	Concentración (µg/L)	CV%
LAS	5	1	12,9
		10	6,7
		50	6,5
MON	5	1	10
		10	2,9
		50	5,3
SAL	5	1	12,7
		10	7,6
		50	2,0

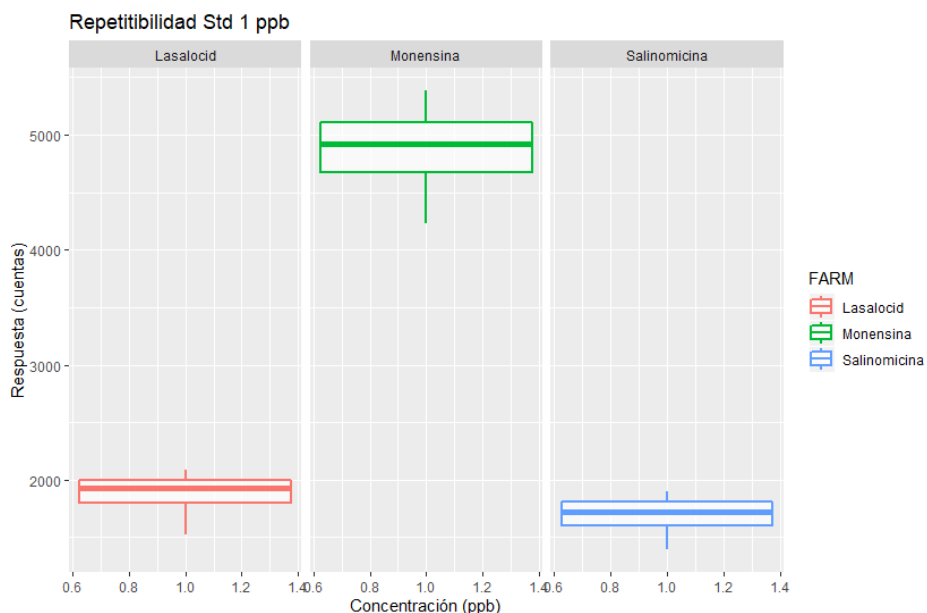


Figura 17. Repetibilidad de inyecciones de lasalocid, monensina y salinomicina para soluciones de concentración de 1 µg/L.

3.8.2. Linealidad

En el pasaje a de HPLC-MS a UHPLC-MS/MS, se observa una ampliación del rango lineal, el cual incluye desde 0,1 hasta 100 µg/L (Figura 18, Tabla 10). En todos los casos, los modelos lineales ajustan con un R^2 mayor a 0.99 con una confianza del 95% ($\alpha = 0,05$). La mayor especificidad y sensibilidad que presenta el MS/MS, tal como se mencionó en apartados anteriores, mejora el rango de trabajo especialmente en la zona de bajas concentraciones, ampliando el rango de 1 a 0.1 µg/L en la inyección. De los analitos estudiados la monensina representa la molécula con mayor respuesta específica, medida a través de su pendiente. La mejora en la sensibilidad, alcanzando concentraciones de órdenes de magnitud inferiores, permitió ampliar el rango de trabajo en un intervalo lineal y a concentraciones inferiores al microgramo en el litro. Los valores obtenidos son comparables a los revisados y reportados por Hansen para metodologías similares, donde incluso se observan rangos que alcanzan el orden de los ng/L o partes por millón (Hansen et al., 2009).

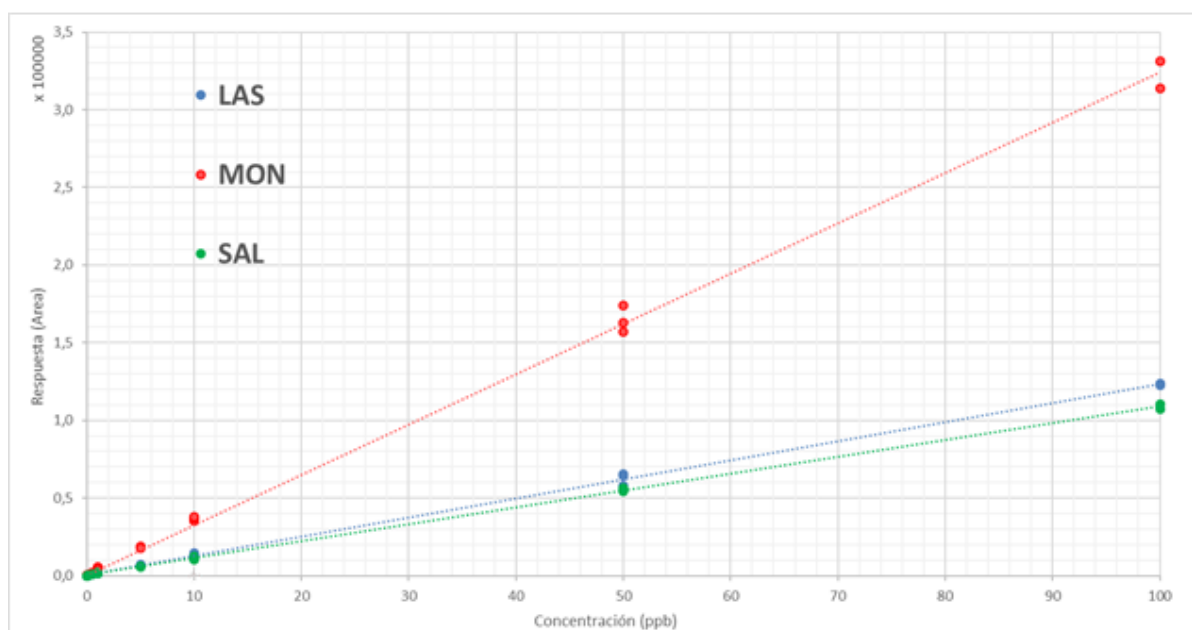


Figura 18. Recta de calibración típica para lasalocid, monensina y salinomycin en un rango de 0,1 a 100 ppb. Monensina representa la mayor respuesta específica en su pendiente de cuentas/masa de analito.

Tabla 10. Parámetros de ajuste lineal para rectas de calibración de lasalocid, monensina y salinomicina con un 95% de confianza ($\alpha = 0,05$).

Analito	n	R ²	p-valor (Modelo)	p-valor (Falta de ajuste)	Pendiente (AreaL / μ g)	Error Estándar
LAS	25	0,9987	<0,0001	0,9954	1232,94	9,74
MON	24	0,9982	<0,0001	0,8954	3221,99	30,49
SAL	25	0,9994	<0,0001	0,9134	1089,31	5,60

3.8.3. Otros parámetros cromatográficos para la técnica UHPLC

Otros parámetros ajustados fueron los vinculados a las condiciones separativas, en especial las fases móviles y el gradiente de elución. En estas condiciones, el uso de ACN no favorecía una simetría apropiada para lasalocid, tal como ha sido reportado anteriormente (Broekaert et al., 2011). Se testeó una fase orgánica solo con MeOH, la cual produjo resultados positivos tanto en la simetría como en la resolución de los picos. En cuanto al gradiente, se incrementó de 100% de fase A a 50% de fase A más 50% de fase B en el primer minuto, a 10% de fase A y 90% de fase B después de 1,5 minutos, y finalmente a 100% de fase B en un caudal de 0.4 mL/min (A: solución acuosa de ácido fórmico al 0,05%; B: solución en MeOH de ácido fórmico al 0,05%). El volumen de inyección de la muestra fue de 20 μ l. Las temperaturas respectivas para el bloque fuente de *electrospray* y la etapa de desolvatación fueron 120 y 450°C. Se utilizó gas nitrógeno para secar y nebulizar.

3.8.4. Tiempo de análisis.

Otra de las ventajas que presenta el trabajo en el UHPLC implica la reducción en el tiempo de análisis, desde 14 min en HPLC a 5 min en las nuevas condiciones. En el contexto científico nacional actual, donde prima el desfinanciamiento en materia científica y aún más en materia

de infraestructura, el acceso a este tipo de equipamiento de alta complejidad resulta difícil y costoso. Estimativamente, un análisis de 100 muestras por HPLC-MS demandaría unas 23 horas, mientras que en un sistema UHPLC-MS/MS este tiempo se reduce a 8 horas, además de minimizar el uso de solventes. Trabajar con sistemas que permiten obtener métodos rápidos sin sacrificar resolución ni sensibilidad resulta de gran importancia, optimizando el tiempo de uso de estos equipamientos reduciendo además las horas de uso de los sistemas y maximizando la ganancia.

3.9. Tetraciclinas

El trabajo con estas moléculas se llevó a cabo durante la primera etapa de la tesis, realizándose exploraciones metodológicas únicamente mediante HPLC-MS, las cuales se describirán a continuación.

3.9.1. Parámetros de ionización

Los parámetros de ionización para estas moléculas se tomaron de la bibliografía (Zhao y Lucas, 2015).

Las transiciones más abundantes correspondieron con las reportadas por distintos autores según el *review* publicado por (Díaz-Cruz y Barceló, 2006). En los tres casos, los iones precursores corresponden al $[M+H]^+$, mientras que los fragmentos mayoritarios involucran la pérdida de amonio o amonio y agua simultáneamente. Los iones precursores y las rupturas mayoritarias pueden observarse en la Tabla 11.

Tabla 11. Iones precursores y productos estudiados para las 3 tetraciclinas estudiadas.

Analito	Ion precursor	m/z	Producto 1	m/z	Producto 2	m/z
TTC	$[M+H]^+$	444	$[M-H_2O-NH_3+H]^+$	410	$[M-NH_3+H]^+$	428
OTC	$[M+H]^+$	461	$[M-H_2O-NH_3+H]^+$	426	$[M-NH_3+H]^+$	444
CTC	$[M+H]^+$	479	$[M-NH_3+H]^+$	462	$[M-H_2O-NH_3+H]^+$	444

3.9.2. Condiciones de corrida cromatográfica

En base a información de la literatura y del material disponible (columnas cromatográficas, solventes, etc.) se evaluaron distintas condiciones de corrida para los 3 analitos a estudiar (Tetraciclina – TTC, Oxitetraciclina – OTC y Clortetraciclina – CTC). Se utilizó un gradiente de fase móvil compuesto por:

- A: Solución de ácido fórmico 0,1% en Agua miliQ
- B: Solución de ácido fórmico 0,1% en ACN.

La fase móvil estaba compuesta inicialmente por 50% B, con un aumento de B hasta 80% entre los 2 y 4 min, manteniéndose hasta los 10 min. Se trabajó a un caudal de 0,3 ml/min.

La columna utilizada fue una Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (Agilent®), de 2,1mm x 150 mm x 5 µm, por ser la que presento mejor forma de los picos cromatográficos durante la evaluación de desempeño.

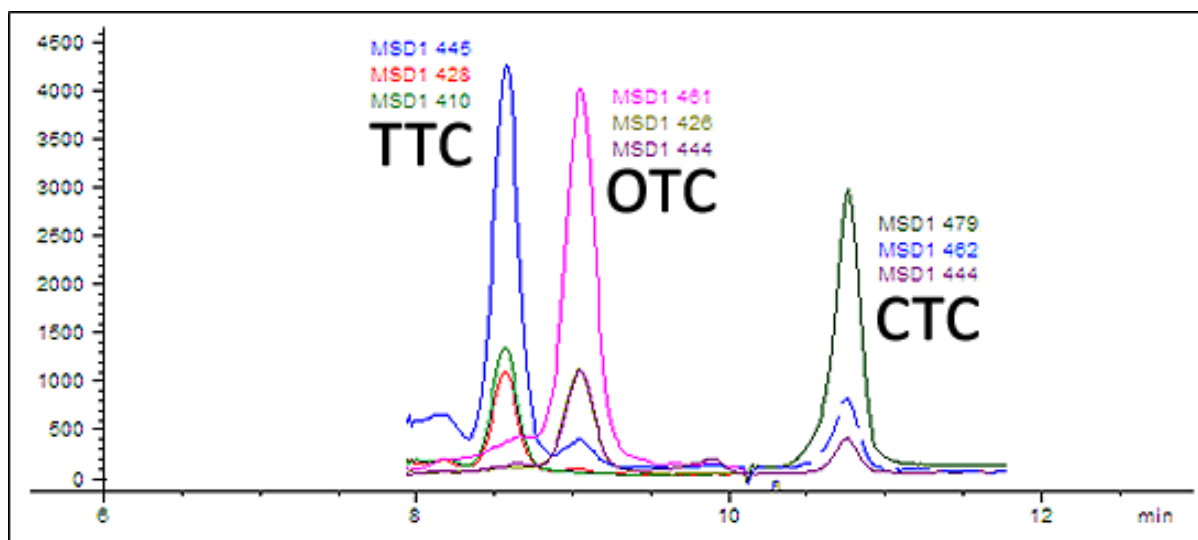


Figura 19. Cromatograma obtenido para una solución estándar de 10 ppb de Tetraciclina, Oxitetraciclina y Clortetraciclina (en orden temporal). Asociado a cada pico se pueden observar las transiciones de masas correspondientes.

3.9.3. Parámetros del método: Linealidad, repetibilidad y sensibilidad

El método resultó lineal en el rango de 1 a 50 $\mu\text{g/L}$, obteniéndose coeficientes de correlación adecuados y correspondientes a lo reportado en la literatura con significancia del 95% ($R^2 > 0,98$) para los 3 analitos. En cuanto a la repetibilidad, se obtuvieron variaciones de 10, 6 y 17% ($n = 5$) para estándares de 10 $\mu\text{g/L}$ de TTC, OTC y CTC respectivamente. Todos los parámetros característicos se encuentran por debajo del 20% sugerido por SANTE. Es destacable la menor repetibilidad de CTC ($\alpha = 0.05$) respecto a los otros dos analitos, e incluso a los ionóforos.

Las tetraciclinas son conocidas por presentar grandes desafíos analíticos en su determinación (Anderson et al., 2005). La química de estos compuestos involucra múltiples factores propios que condicionan su adecuada detección, desde los grupos funcionales y sus posiciones, los equilibrios ácido-base que involucran, y la posibilidad de formar complejos con metales y otros ligandos (Anderson et al., 2005). Estos factores pueden alterar fácilmente desde la solubilidad o los equilibrios de pH de las moléculas, así como favorecer la conversión en isómeros más estables según cada condición (Desmarchelier et al., 2018; Sørensen et al.,

2004). Asimismo, las tetraciclinas pueden sufrir procesos de hidrólisis o fotólisis, obteniendo una gran variedad de metabolitos que habitualmente resultan ser epi-tetraciclinas, anhidro-tetraciclinas o iso-tetraciclinas. Esto se traduce en una elevada línea de base, disminuyendo la sensibilidad y por ende los límites de detección y cuantificación de estos compuestos (Anderson et al., 2005).

Los límites de detección y cuantificación obtenidos en función de la señal/ruido para estos compuestos se presentan en la Tabla 14. Los valores obtenidos son comparables a los observados para ionóforos en HPLC-MS.

3.10. Metodologías de pre-tratamiento para el análisis de ionóforos y tetraciclinas

3.10.1. Secado de muestras

De manera general, dado que la gran mayoría de métodos actuales recurren al secado de muestras en solventes orgánicos para concentrar los analitos presentes, se realizaron pruebas exploratorias evaluando posibles pérdidas por codestilación desde extractos (EPA, 2007; Furtula et al., 2009).

El diseño incluyó el estudio de 3 factores (concentración, solvente y uso de agentes de retención – “keepers”). Se sobreagregaron 10 mL de MeOH y Hexano, a concentraciones de 10 y 100 µg/L. Se estudió el efecto de incorporar agentes auxiliares de evaporación (1-octanol y Glicerina) para evitar fenómenos de *stripping* (Matthiessen, 1997) Las muestras se secaron en las condiciones habituales de este tipo de metodologías por uso de un baño termostático

a 40°C bajo corriente de N₂. No se observaron efectos significativos de las interacciones de los factores estudiados ($\alpha = 0,05$). El uso de *keepers* redujo la eficiencia del proceso, obteniendo recuperaciones significativamente menores para glicerina y 1-octanol, incluso obteniendo en las que no se detectaron fármacos. En la Tabla 12 se muestran las recuperaciones promedio de las dos concentraciones estudiadas para ionóforos. Para el caso de las tetraciclinas, los valores de recuperación para ambos solventes variaron entre 75-91% a un nivel de sobreagregado de 10 µg/L. Al igual que para ionóforos, el tratamiento sin agregado de *keepers* resultó el más eficiente (información no mostrada). Los valores de recuperación fueron contemplados en las recuperaciones globales de las metodologías discutidas en las secciones próximas.

Tabla 12. Recuperación de ionóforos a partir de ensayos de secado bajo corriente de nitrógeno en condiciones óptimas (sin uso de agregados de auxiliares de evaporación).

Secado	LAS		MON		SAL	
Solvente	Hexano	MeOH	Hexano	MeOH	Hexano	MeOH
% Recuperación \pm SD	78 \pm 11	101 \pm 10	84 \pm 9	94 \pm 8	78 \pm 11	89 \pm 10

3.10.2. Aguas

3.10.2.1. Extracción en fase sólida / *Solid phase extraction* (SPE)

La extracción en fase sólida consiste en el pasaje de una muestra líquida a través de una fase estacionaria soportada habitualmente en dispositivos contenedores (cartuchos), cuyo objetivo es retener los analitos de interés a la vez que deja eluir el resto de los componentes de la muestra. Finalmente, los analitos se desorben con un solvente de polaridad apropiada, concentrándolos en un extracto de volumen inferior a inicial (EPA, 1996). Habitualmente, el método finaliza con un secado del extracto que luego puede ser reconstituido en un mínimo volumen de solvente (el uso de la fase móvil correspondiente suele ser ampliamente

recomendado), maximizando la concentración de los analitos. Esta técnica presenta múltiples ventajas, debido a:

- Gran capacidad de eliminar impurezas
- Concentración de los analitos
- Selectiva pero no específica

Antes del procedimiento, las muestras de agua se filtraron por 0,45 μm (100 ml) para separar la fracción soluble de la particulada (APHA, 1998), y luego se diluyeron con 100 ml de una solución de Na_2EDTA 5 mM con el fin de impedir la formación de complejos con metales polivalentes por complejación/secuestro con EDTA (Blackwell et al., 2004; Hao et al., 2005). El pH se ajustó a 7 previo a la extracción, para maximizar la solubilidad de los ionóforos, y luego las muestras pasaron a través de un cartucho de 60 mg Waters® Oasis C₁₈ HLB (Zhang y Zhou, 2007). Otros autores han reportado la ventaja en cuanto a las recuperaciones, a la manipulación e incluso la significancia económica que poseen estos cartuchos frente a los de 120 mg (Hao et al., 2005). Otra ventaja de los cartuchos HLB es la ausencia de grupos silanoles, evitando la retención de metales indeseados en el cartucho. Antes de la SPE, los cartuchos se acondicionaron primero con 5 ml de metanol (MeOH) y 5 ml de agua ultrapura. Luego, las muestras se extrajeron a un caudal de 5 a 10 ml / min al vacío en un aparato Visiprep (Supelco, Bellefonte, PA). Después de la extracción, los cartuchos se enjuagaron con 5 ml de agua de calidad nanopure y se secaron al vacío durante 30 min. Después de la elución con 5 ml de MeOH, los extractos se redujeron a sequedad bajo un flujo de nitrógeno y luego se reconstituyeron con 0,5 ml de MeOH en viales de color ámbar en concordancia con lo propuesto por Elorriaga y col (2013) para fármacos de uso humano. Antes de la inyección, se

agregaron 0,5 ml de Na₂EDTA 5 mM a las muestras y los estándares, seguido de filtración a través de membranas de nylon de 0,22 µm y posterior análisis instrumental.



Figura 20. Sistema de SPE conectado.

Respuesta analítica de SPE

Los límites de detección del método para cada compuesto se listan en la Tabla 14. Los límites obtenidos para todos los compuestos estuvieron dentro del rango de valores previamente publicados por otros investigadores (Díaz-Cruz y Barceló, 2005; Iglesias et al., 2012). Las recuperaciones promedio, para las muestras sobreagregadas con ionóforos (Tabla 13), fueron consistentes con los valores informados para estos contaminantes (Cha et al., 2005; Hao et al., 2005; Song et al., 2007; Zhang y Zhou, 2007). En todos los casos, las RSD% son menores al 20% recomendado, por lo que el método de sobreagregado funciona apropiadamente tal como se recomienda en la bibliografía para el estudio de estos compuestos ante la falta de trazadores isotópicos equivalentes (Hansen et al., 2009). Para el caso de las tetraciclinas, se observan recuperaciones inferiores, siendo las de TTC y CTC inferiores al 70% recomendado por SANTE (European Commission DG-SANTE, 2019). Una de las causas puede asociarse a la extracción conjunta de los analitos a pH = 7, dado que algunos autores reportan la

conveniencia de la extracción a pH inferior a 4 para esas moléculas (Díaz-Cruz y Barceló, 2006; Zhu et al., 2001). No se observaron diferencias estadísticas entre las recuperaciones desde agua miliQ y superficiales naturales, lo que implica un efecto de matriz prácticamente nulo para este tipo de muestras (Taylor et al., 2005). Posiblemente, la conversión de cada uno de los antibióticos ionóforos en un solo aducto de sodio y el efecto quelante de Na₂EDTA impiden una interacción con otras especies mayoritarias de la matriz acuosa con otras especies (Cha et al., 2005; Volmer y Lock, 1998). El uso de este tipo de dopantes, además tiene efectos sobre el aumento de su solubilidad en agua y estabilidad de la señal (Sun et al., 2016).

3.10.3. Sólidos en suspensión (SS)

Una vez filtradas las muestras de agua, los sólidos en suspensión remanentes en los filtros de nylon fueron conservados en frío hasta posterior análisis. Para la extracción, los filtros se colocaron en tubos de polipropileno (Falcon®) y se añadieron 3 mL de una mezcla de ACN/MeOH 65:35, en base a resultados obtenidos de recuperación para sedimentos mediante *QuEChERS* (Sección 3.11.1). Los sistemas se sonicaron por dos ciclos de 10 minutos, y se trasvasaron a tubos Falcon® de 15 mL. El proceso se repitió una vez más, juntando ambas fracciones, y luego fueron centrifugarlas con el fin de sedimentar los sólidos y facilitar la separación del sobrenadante (Darwano et al., 2014). Los extractos se secaron bajo corriente de nitrógeno a 40°C y se resuspendieron en 0,5 mL de MeOH, a los cuales se añadieron 0,5 mL de Na₂EDTA 5mM previo a la inyección.

El análisis de los extractos de SS se realizó mediante HPLC-MS, por lo cual los LOD y LOC del método están referidos a los límites instrumentales correspondientes (Tabla 8). A diferencia

de las muestras de agua, cuyo volumen de muestras es constante, en el caso de las muestras de material particulado, la masa del mismo se obtiene en función de la cantidad de sólidos en suspensión de la columna de agua al momento de la toma de muestra. La masa de SS se obtiene restándole la masa del filtro sin usar a la masa del filtro con SS, ambos secados a temperatura ambiente. Por consiguiente, los LDM y LCM están supeditados a cada muestra, y serán función de la masa obtenida al filtrar 100 mL de agua natural. En la Tabla 14 se pueden observar los rangos de LDM y LCM para cada analito. El método es altamente dependiente de la masa capturada de material particulado, siendo poco sensible para aguas naturales con baja proporción de sólidos, donde los límites de detección pueden alcanzar las decenas de ng/g, o incluso centenas para el caso de las tetraciclinas. Existen algunas alternativas, como aumentar el volumen de agua filtrada para aumentar la masa colectada, pero el tratamiento puede demandar mucho tiempo y requerir un gran volumen de muestra. En el caso de la muestra de agua colectada en Arroyo Artalaz (cuenca del río Uruguay), la masa de sólidos en suspensión obtenidos fue de 0,003 g/100 mL de agua: se requerirían filtrar 1 L de muestra para obtener una masa tal que se alcance el límite de detección promedio (aproximadamente 1 µg/L para ionóforos), y 10 L para reducirlo al mínimo observado en este trabajo, de aproximadamente 0,1 µg/L (para monensina).

Se comparó el efecto matriz obtenido al analizar ionóforos, comparando los efectos de preparar soluciones en agua miliQ versus la preparación en agua declorinada (a fines de evaluar un agua con mayor contenido de iones y baja materia orgánica) y en aguas superficiales de la región (con contenido de materia orgánica natural, del orden de 20-50 mgO₂/L). En todos los casos, las aguas fueron ajustadas a pH = 7 mediante el uso de buffers apropiados favorecer la solubilidad de los analitos (Sun et al., 2016). Para las aguas

superficiales, muestras provenientes de sistemas acuáticos diversos fueron sobreagregadas, de manera de interpretar el resultado de manera global (y más conservador). Los resultados indican que en el caso de agua declorinada existe una supresión iónica lo cual disminuye la señal detectada, mientras que, en el caso de las aguas superficiales estudiadas, el efecto se vuelve mucho menos relevante (la variación máxima es del 5%) e incluso pasa a exaltar las señales para MON y SAL. Por otra parte, puede ocurrir que, a bajas concentraciones, la materia orgánica disuelta actúe como *scavenger* (o “secuestrador”) de cationes (como Ca^{+2} y Mg^{+2}) y otras impurezas, favoreciendo la ionización de los ionóforos (Wickramasekara et al., 2012).

3.10.4. Desventajas de la SPE

A pesar de sus grandes bondades, la técnica de SPE presenta algunas limitaciones que dieron paso a la investigación de estrategias alternativas de análisis:

- El costo económico de los cartuchos
- La necesidad de trabajar con agua filtrada

En primer lugar, vistas las recuperaciones obtenidas para tetraciclinas, se esperaría trabajar de manera independiente en su extracción a pH ácidos (2,5 – 4). Esto requeriría duplicar el gasto de cartuchos por muestra, lo cual demandaría un costo económico superior a U\$S 15 además de duplicar el tiempo de análisis y el material involucrado (descartables, solventes, etc.) en los análisis, especialmente para un estudio de base y por primera vez como es el presente trabajo.

Por otra parte, trabajar con un lecho como el formado en el cartucho de SPE requiere la eliminación de sólidos que puedan obstruir los canales de flujo de agua y solvente, por lo tanto, la filtración es un paso relevante. Sin embargo, algunos organismos de control, como el Water Framework Directive y el Environmental Quality Standards Directive exigen el análisis de concentración de contaminantes sobre agua total, definiéndola como el aporte conjunto de la fase soluble y la sorbida a partículas, cuyo aporte puede ser eliminado durante la filtración (Mooney et al., 2020).

Considerando todos los motivos mencionados anteriormente, se indagó sobre otra posible técnica de extracción que permita trabajar con agua total, incorporando la extracción de los antibióticos presentes en la fase sólida, y pueda ajustarse a las normativas mencionadas.

3.10.5. Metodología alternativa de análisis para aguas (M.A.)

Para el estudio de la aplicabilidad de la técnica al análisis de aguas, se trabajó específicamente con la familia de los ionóforos debido a su naturaleza hidrofóbica y datos existentes en otros lugares del mundo, y particularmente con lasalocid, monensina y salinomycin. Dentro de las estrategias alternativas de exploración se consideró un método adaptado del propuesto por Sun et al. (2013). El mismo consiste en un acondicionamiento de 30,00 ml de la muestra con 7,50 mL de Buffer McIlvaine¹ (pH = 7), Na₂EDTA 10 mM, 2,50 mL de metanol (MeOH) como vehiculizante 1:12 con la fase acuosa, seguido por 2 ciclos de sonicación de 10 minutos cada uno. Sobre dicho medio líquido se realiza una extracción líquido-líquido mediante 2 contactos

¹ El buffer McIlvaine también se conoce como buffer citrato-fosfato, y está compuesto por una solución de Na₂HPO₄ 0.2M y ácido cítrico 0.1M. Para obtener el buffer a pH = 7 (100 mL), se requieren 82.35 mL de fosfato y 17.65 mL de ácido cítrico.

consecutivos con 5,00 mL de Hexano cada uno en relación 1:6 con la fase acuosa y agitación. Se dejan separar las fases, los extractos de hexano se unifican, luego son llevados a sequedad con corriente de N₂, sin agregado de auxiliares, y resuspendidos en 0,5 ml de MeOH. Los extractos metanólicos fueron conservados a -20°C hasta su análisis instrumental. Previo al análisis, las muestras se diluyen 1:1 con Na₂EDTA 5 mM y son filtradas por 0,45 µm, sobre viales cromatográficos de 2 ml.

Tabla 13. Recuperaciones medias de ionóforos en dos tipos de aguas respecto de la técnica de extracción utilizadas.

Analito	Nivel de concentración	Recuperación media ± RSD (%)			
		SPE		Metodología adaptada	
		Agua miliQ (n = 15)	Agua superficial (n = 12)	Agua miliQ (n = 8)	Agua superficial (n = 8)
LAS	10 µg/L	88 ± 7	85 ± 10	69 ± 14	46 ± 12
MON	10 µg/L	93 ± 7	96 ± 6	63 ± 8	79 ± 9
SAL	10 µg/L	96 ± 11	101 ± 9	101 ± 14	103 ± 10
TTC	50 µg/L	56 ± 12	64 ± 10	N/A	N/A
OTC	50 µg/L	75 ± 8	72 ± 6	N/A	N/A
CTC	50 µg/L	38 ± 12	42 ± 12	N/A	N/A

En la Tabla 14 se presentan los LDM y LCM de la técnica, así como los porcentajes de recuperación. Los límites son apropiados y acordes al estudio de trazas de estos compuestos, tal como se comparó anteriormente para SPE. Analizando las recuperaciones, las mismas son significativamente menores a las observadas en el método de SPE ($\alpha = 0,05$). La técnica se basa en el reparto agua – hexano de los ionóforos, siendo este mecanismo mucho menos favorecido que el fenómeno de sorción que ocurre entre los analitos y el sorbente de C₁₈ de la columna de SPE. Además, la materia orgánica disuelta puede reducir la eficiencia de la extracción al movilizarse hacia el hexano, en lugar de quedar retenida en el sorbente (Kim y Carlson, 2005; Sun et al., 2013a). Otra desventaja del método es la pérdida de sensibilidad debido al volumen de muestra (30 mL en lugar de 100 mL), por lo cual el factor de

concentración se reduce a un 30% del 100x obtenido en la técnica SPE. Por otra parte, el método presenta ciertas ventajas que resultan de interés para continuar la exploración y aplicación de la metodología:

- Las recuperaciones observadas si bien bajas, son aceptables para un método sencillo y de bajo costo que posibilita procesar numerosas muestras en simultaneo Las RSD% cumplen con la normativa SANTE (European Commission DG-SANTE, 2019).
- Los costos asociados (reactivos y de material) y el tiempo de la técnica son mucho menores en relación a la SPE, siendo factores importantes a la hora de considerar metodologías apropiadas de análisis (Moloney et al., 2012).
- Permite trabajar con agua total, tal como lo exigen las normativas previamente citadas (Mooney et al., 2020).

Con respecto al efecto matriz, la exaltación de señal que se observó en SPE dejó de expresarse para lasalocid y monensina, siendo únicamente persistente para salinomicina. Como menciona Sun (2013) en el trabajo original, el uso de hexano presenta la ventaja de un bajo arrastre de materia orgánica polar. Sin embargo, según el tipo de materia orgánica presente en la muestra puede ocurrir que, en las condiciones de la extracción quede un remanente en el extracto final (Sun et al., 2013a).

En base a los resultados obtenidos, se han llevado adelante distintos ensayos para estudiar la influencia de los distintos pasos sobre la recuperación global. Los mismos fueron abarcados en trabajos finales de grado dirigidos por el grupo de trabajo y donde el tesista actuó como tutor. Algunos resultados preliminares indican la necesidad de realizar el procedimiento en frío, añadiendo los solventes 24h antes de la extracción y residencia en heladera por 24h, entre otros. Uno de los resultados pendientes involucra la aplicación de un *clean-up* al

extracto final con Na_2HPO_4 y acetato de etilo, con fines de eliminar la materia orgánica remanente y disminuir la supresión iónica (Sun et al., 2013a).

En cuanto a las tetraciclinas, no se considera que este método pueda ser efectivo, dado que teniendo en cuenta su solubilidad en agua y la baja solubilidad en hexano (Sección 1.2.2), es posible que tiendan a quedarse remanentes en la fracción acuosa en lugar de movilizarse a la fase orgánica, impidiendo así el paso de concentración aplicado para los ionóforos.

Tabla 14. Limites instrumentales y metodológicos para cada compuesto.

	PARÁMETRO	LAS	MON	SAL	TTC	OTC	CTC
Instrumentales ($\mu\text{g/l}$)	LOD	0,03	0,02	0,03	0,2	0,1	0,5
	LOQ	0,11	0,08	0,09	0,5	0,4	1
Agua spe (ng/l)	LDM	0,3	0,2	0,3	2	1	5
	LCM	1,1	0,8	0,9	5	4	10
Agua m.a. (ng/l)	LDM	1	0,67	1	N/A	N/A	N/A
	LCM	3,7	2,7	3	N/A	N/A	N/A
SS (ng/g)	LDM	0,15-10,5	0,1-7,0	0,15-10,5	1,0-70,2	0,5-35,1	2,5-175,4
	LCM	0,55-38,6	0,4-28,1	0,45-31,6	2,5-175,4	2,0-140,4	5,0-350,9
Sedimento que (ng/kg)	LDM	18	12	18	120	60	300
	LCM	66	48	54	300	240	600
Sedimento m.a. (ng/kg)	LDM	10	6,7	10	N/A	N/A	N/A
	LCM	37	27	30	N/A	N/A	N/A

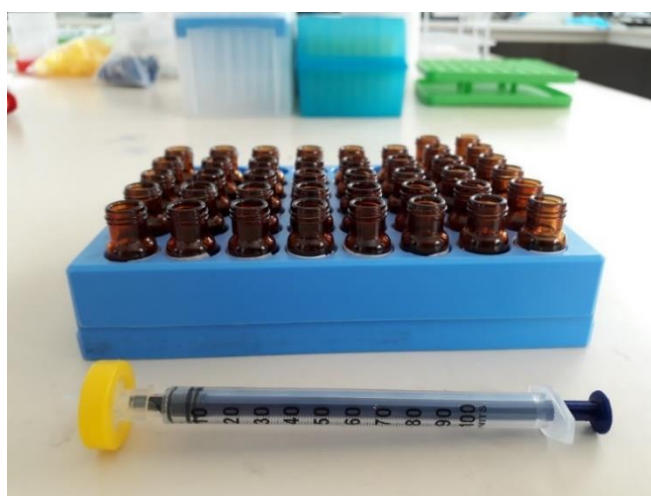


Figura 21. Vialera de inyección cargada post-filtración por $0.45 \mu\text{m}$.

3.11. Matrices Sólidas – Suelos, Sedimentos y Camas de Pollo

A diferencia de lo reportado para aguas, en el caso de matrices sólidas existe una gran diversidad de técnicas desarrolladas para extraer y concentrar fármacos veterinarios, que van desde extracciones simples con solventes orgánicos como metanol hasta métodos más complejos que requieren el uso de buffers y *clean-ups* con SPE. En general, se reportan métodos del tipo:

- Extracción con solventes orgánicos: Directa o metodología *QuEChERS* (en inglés, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*)
- Extracción con solventes acuosos/buffers seguido de SPE

En las siguientes secciones se describirán las principales versiones exploradas de las metodologías de pretratamiento de muestras para análisis de ionóforos y tetraciclinas. Las descripciones corresponden a los resultados obtenidos para sedimentos de manera representativa, aclarando en los casos que sea necesario sobre variaciones respecto a suelos o camas de pollo.

3.11.1. *QuEChERS*

Inicialmente y en función de la experiencia del grupo de trabajo (Mac Loughlin et al., 2017), se realizaron ensayos exploratorios según la metodología *QuEChERS* (Anastassiades et al., 2003; Desmarchelier et al., 2018). Para el método utilizado, se tomaron 7 g de sedimento en tubo de 50 mL de polipropileno (Falcon®) a los que se añadieron 15 mL de solvente orgánico y se realizaron 2 ciclos de tratamiento por ultrasonido por 15'. A cada tubo se le añadieron 6

g de MgSO_4 anh., 1 g de NaCl y 0,5 g de Na_2EDTA . Las sales poseen la función de eliminar agua y provocar un efecto de *salting out*, promoviendo el reparto líquido-líquido de los analitos hacia el solvente orgánico. Como modificación, en este trabajo se utilizó además Na_2EDTA ya que su propiedad quelante permite secuestrar cationes polivalentes en exceso que puedan afectar el reparto de los fármacos desde el sólido o disminuir su detección por procesos de asociación con cationes divalentes mayoritarios como Ca^{++} y Mg^{++} . Muchos de los métodos reportados para la determinación de plaguicidas indican el uso de ácido acético como aditivo en el solvente de extracción y acetato de sodio en lugar de NaCl, con el objetivo de llevar el pH del sistema a aproximadamente 5 para evitar hidrólisis en medio alcalino (AOAC, 2007). En el caso de los ionóforos, tal pH podría presentar dos desventajas: no obtener una eficiencia de extracción apropiada, ya que la solubilidad de los ionóforos aumenta a pH próximo a 7 (Sun et al., 2016) (y promover la hidrólisis de los mismos como se ha discutido en secciones previas. El tubo luego es centrifugado, y el sobrenadante se colecta en otro tubo individual. En función de la sensibilidad esperada para trabajar a niveles ambientales, se tomaron 5 mL del sobrenadante y se llevaron a sequedad bajo corriente de N_2 sin uso de agentes auxiliares, para luego reconstituir el extracto con 0,5 mL de MeOH y 0,5 mL de Na_2EDTA 5 mM (este último previo a la inyección).

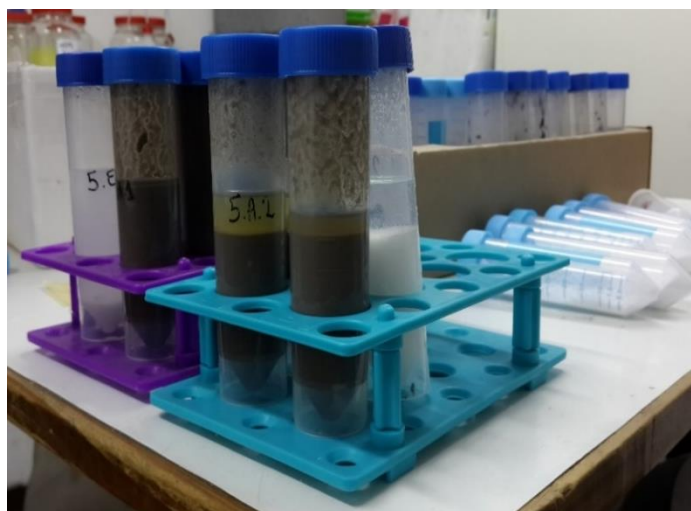


Figura 22. Tubos de polipropileno conteniendo el remanente de QuEChERS post-extracción.

En la Figura 23 se presentan los resultados de los diferentes ensayos realizados para el ajuste del método. Para determinar la mejor opción en referencia al solvente de extracción, se realizó un diseño experimental con el fin de evaluar la recuperación, de acuerdo a 2 factores: el solvente (o mezcla de extracción) y la concentración de analito. Se realizaron 4 tratamientos de solventes según estrategias clásicas de la metodología *QuEChERS* (Anastassiades et al., 2003; Broekaert et al., 2011) (**T1-MeOH; T2-MeOH/ACN 65:35, T3-MeOH/ACN 35:65, T4-ACN**), evaluados a dos concentraciones de sobreagregado, sumados dos tratamientos blancos (sin sobreagregar), todos procesados por triplicado. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las comparaciones se realizaron mediante el test de Tukey para una significancia del 95%.

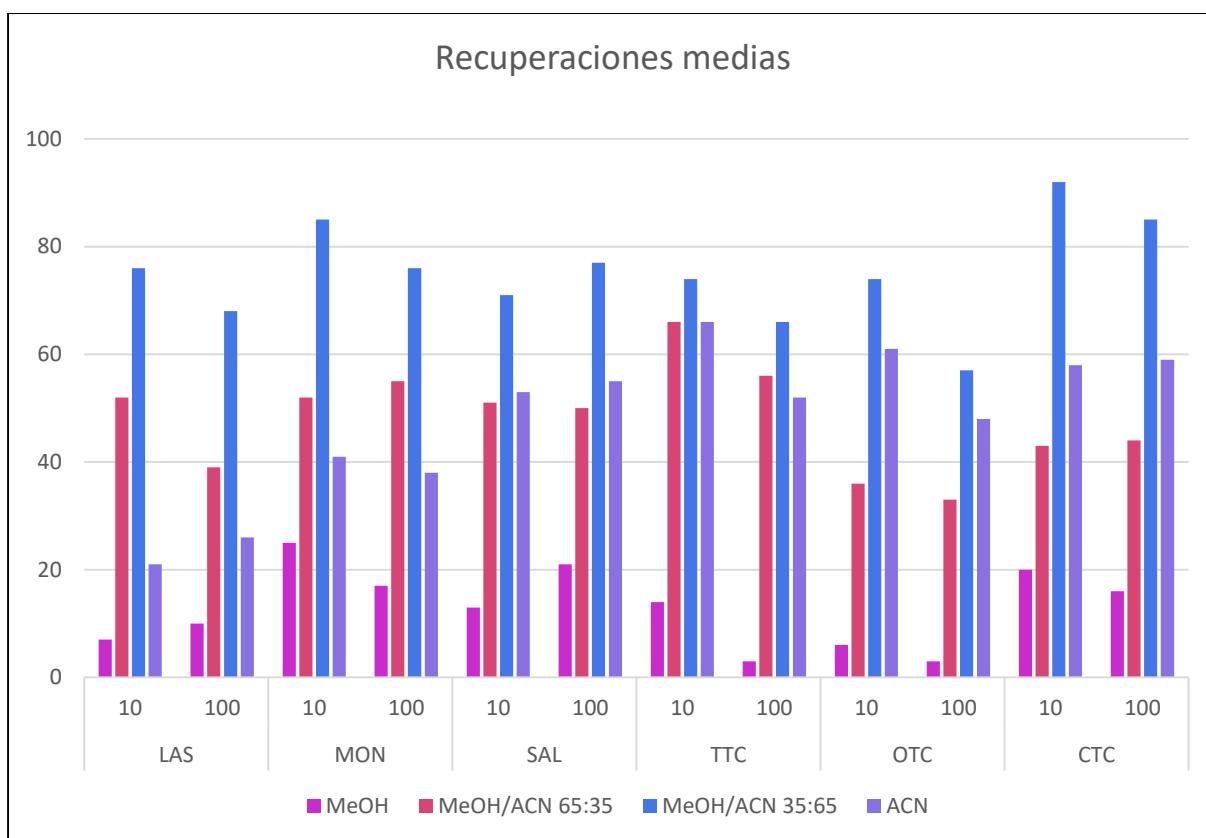


Figura 23. Recuperaciones medias de fármacos veterinarios obtenidas con distintas mezclas de solventes de extracción.

Los resultados indicaron que la recuperación del tratamiento 3 (MeOH/ACN 35:65) es significativamente superior al resto de los tratamientos ($T_3 > T_4 - T_2 > T_1$), siendo este el único que presenta una media de la recuperación por encima del 70% para todos los compuestos al nivel más bajo de sobreagregado y de alto interés ambiental. Para el caso de TTC y OTC, no se observan diferencias entre los tratamientos 3 y 4, excepto para CTC, en la que T3 exhibe recuperaciones significativamente mayores. En todos los casos, el uso de MeOH como único solvente resultó en una recuperación inferior al 30%, sin embargo, su combinación con ACN mejora significativamente la eficiencia de la extracción. Esto puede deberse a que el MeOH puro no genera el efecto de *salting out*, mientras que, al acompañar a otros solventes polares no próticos, favorece la solubilización de analitos como ionóforos (S en metanol alta). Por otra parte, no se observan diferencias significativas en el análisis de

recuperación de ionóforos entre ambos niveles de sobreagregado lo que refleja la robustez de la metodología en cuanto a las aplicaciones ambientales, donde no se puede conocer de antemano las concentraciones posibles. En el caso de las tetraciclinas, la recuperación es significativamente mayor a la concentración más baja. En función de los resultados obtenidos, se definió como solvente de extracción a la mezcla MeOH/ACN 35:65, para todos los casos.

Una vez definido el solvente, en ensayos posteriores se estudió la influencia del agregado de agua previa a la extracción, y el uso de **Na_2SO_4 y 0,5 g de Na_2EDTA** frente al **NaCl** . Para ambas familias de compuestos, el agregado de agua no favorece la extracción, siendo las recuperaciones un 24% y 33% (promedios para ionóforos y tetraciclinas respectivamente) menores al tratamiento con sedimento crudo sin diluir. En relación a la sal auxiliar, no se observaron diferencias significativas entre las recuperaciones con los dos tipos de sales. Se observó que los picos cromatográficos derivados de los tratamientos con EDTA presentan mejor geometría que los de NaCl, siendo éste el criterio definitivo para optar por la mezcla de sales.

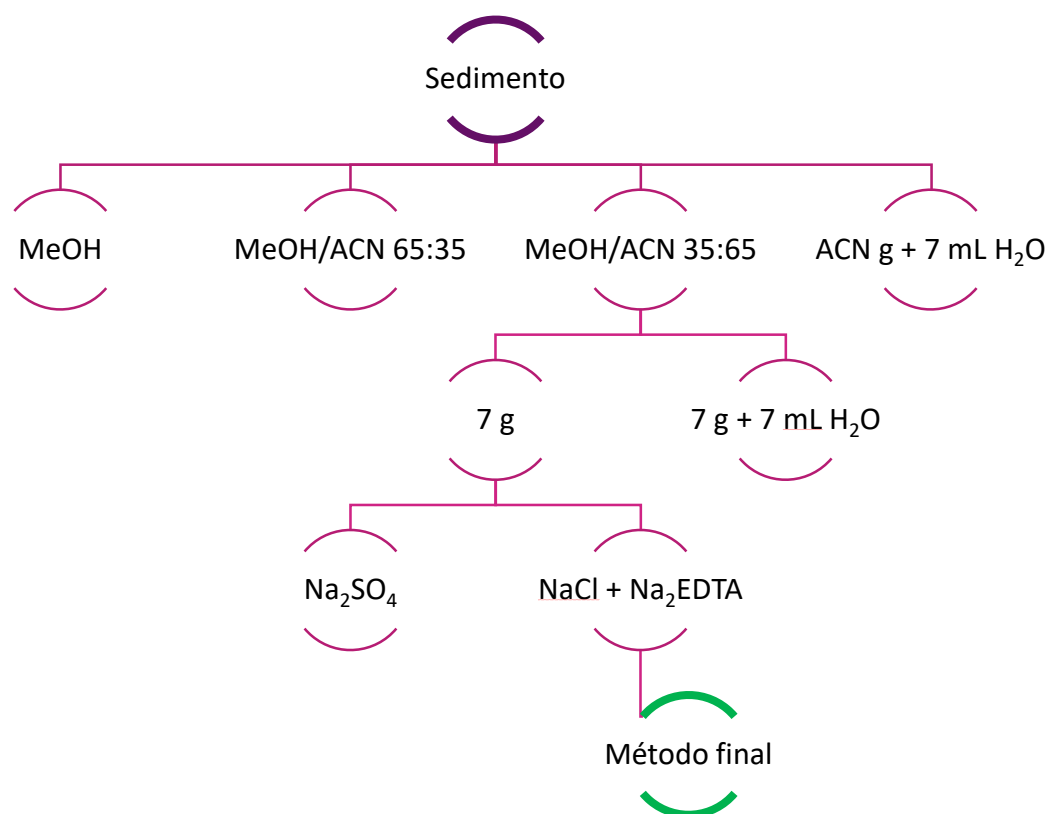


Figura 24. Esquema de optimización de la técnica QuEChERS.

Se realizaron exploraciones del método *QuEChERS* para suelo y CDP. Las recuperaciones obtenidas se encontraron entre el 5 y 20% para ionóforos, y 21-36% para tetraciclinas. Posiblemente factores como el porcentaje de humedad puedan estar afectando la extracción desde ambas matrices. Al igual que para aguas, se aplicó un método derivado del propuesto por Sun et al. (2013), cuyos resultados se presentan a continuación.

Tabla 15. Recuperaciones y precisión para el mejor tratamiento por *QuEChERS*.

<i>QuEChERS</i>	LAS		MON		SAL		TTC		OTC		CTC	
Concentración ug/L	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100
% Recuperación	67	66	81	76	65	60	74	68	60	64	102	95
CV %	10	8	12	10	14	7	15	18	12	10	20	23

3.11.2. Metodología alternativa

Al igual que lo presentado para aguas, se exploró la metodología propuesta por Sun (Sun et al., 2013a) para la determinación de ionóforos en matrices sólidas. La técnica consta de un paso de solubilización con buffer McIlvaine y MeOH, y luego una extracción líquido-líquido con hexano. La ventaja de esta técnica es que permite concentrar levemente los extractos de sedimentos, es económica, y es más específica para el estudio de ionóforos.

Tabla 16. Recuperaciones del método exploratorio y luego de las mejoras.

M.A. (SUN) SEDIMENTOS	LAS		MON		SAL	
CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/L}$	Inicial	Mejorado	Inicial	Mejorado	Inicial	Mejorado
% RECUPERACIÓN	31	56	55	77	79	82
CV %	10	8	12	10	14	18

La técnica se aplicó a suelos y sedimentos, obteniendo las recuperaciones reportadas en la Tabla 16. El método presenta mejoras en los valores de LDM y LCM, debido a una mayor concentración en el extracto final bajo corriente de N_2 . Un análisis comparativo entre la aplicación de esta metodología y *QuEChERS* sobre sedimentos, indicó que la técnica adaptada presenta una mejora significativa en la recuperación de salinomicina, mientras que para monensina y lasalocid se observan recuperaciones significativamente inferiores (Tabla 15 y Tabla 16). Los valores obtenidos en las matrices suelo y cama de pollo también son menores a los reportados por Sun et al (2013a). Estos resultados dieron lugar a explorar diversos puntos de mejora de la técnica. Entre ellos, se destacan la importancia de hidratar anticipadamente las muestras sólidas con el buffer y MeOH, la concentración del buffer utilizado, el agregado de EDTA en el buffer, entre otros. La aplicación de tales mejoras permitió alcanzar recuperaciones superiores, de 56, 80 y 89% para lasalocid, monensina y salinomicina respectivamente.

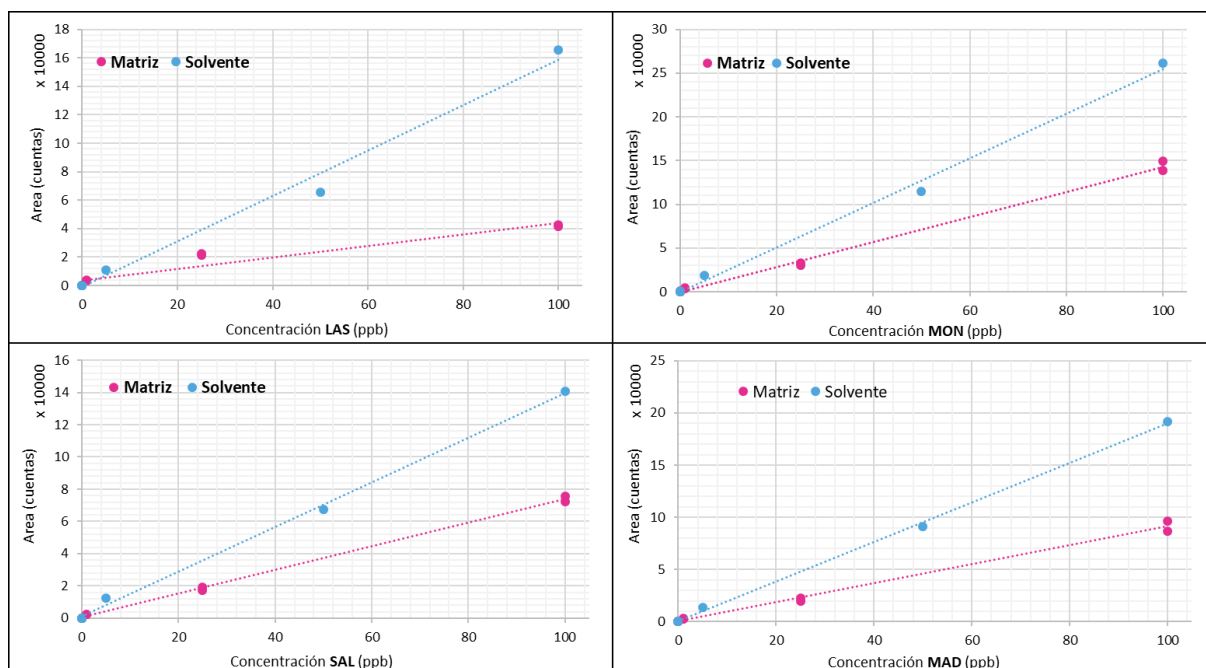


Figura 25. Curvas de calibración para cada ionóforo preparadas en solvente de inyección y en matriz. Las curvas correspondientes a la matriz se muestran en rosa, mientras que en azul las que corresponden al solvente.

Otra exploración realizada involucra el efecto matriz. Dada la diferencia entre los valores reportados por el autor del método y los obtenidos en este trabajo, se prepararon extracciones de sedimentos blancos (y suelos), previamente analizados, con el objetivo de obtener un extracto que represente condiciones fisicoquímicas de matriz similares a las observadas en las muestras. Se realizaron dos curvas de calibración, con sus respectivas réplicas, en las distintas matrices: a) solvente de resuspensión (MeOH + Solución EDTA 5%) y b) solvente de resuspensión (MeOH + Solución EDTA 5%) + matriz. En la Figura 25 se pueden observar las rectas de calibración de los distintos ionóforos preparadas en solvente de reconstitución y en la matriz. El efecto de supresión se vuelve evidente en el último caso respecto a las soluciones puras, obteniendo pendientes significativamente inferiores a las obtenidas en la curva de solvente de reconstitución ($\alpha = 0.05$). En la Tabla 17 se indican las pendientes y la supresión porcentual obtenida para cada una de ellas a través de la relación de pendientes. Es destacable el efecto que se produce sobre lasalocid, con una pérdida de

casi 75% de la señal, lo cual puede estar relacionado con la baja recuperación observada para dicho analito en la metodología adaptada de Sun et al. (2013).

Tabla 17. Pendientes obtenidas para las rectas de calibración en solvente de reconstitución y en la matriz estudiada. La supresión de la señal hace referencia a la relación de las pendientes.

Analito	n	Pendiente Solvente	Pendiente Matriz	Supresión de la señal %
LAS	10	1597,6	402,3	74,8
MON	9	2550,7	1429,7	43,9
SAL	10	1387,4	733,5	47,1
MAD	10	1894,2	910,1	51,9

En función de lo medido instrumentalmente, resulta necesario la preparación de curvas de referencia externas que permitan contemplar estos efectos y no subestimar los valores de concentración obtenidos sobre las muestras ambientales cuantificadas por uso de estándares externos puros. Si bien no resulta práctico preparar una curva para cada muestra, conociendo el tipo y origen de muestras a analizar, pueden realizarse curvas características que contemplen distintos factores de la zona de muestreo como porcentaje de materia orgánica o tipo de sedimento para obtener una calibración más conservadora que si bien puede resultar en mayor trabajo es más adecuado desde lo ambiental (Cimetiere et al., 2013; Matabudul et al., 2001; Taylor, 2005).

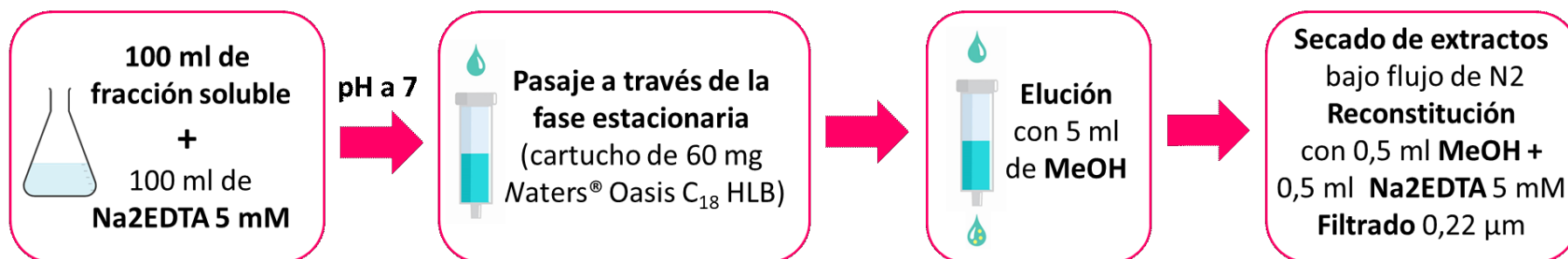
Como se mencionó para el caso de aguas, existen opciones de *clean-up* para tratar el contenido de materia orgánica en los extractos, de manera de mejorar la ionización y no perder sensibilidad. Además, la mayoría de estos efectos ocurren en el frente de solvente de la corrida, por lo tanto, conociendo la retención de los analitos en el sistema, es posible trabajar cromatográficamente para minimizarlos (Taylor, 2005).

3.12. Resultados Relevantes

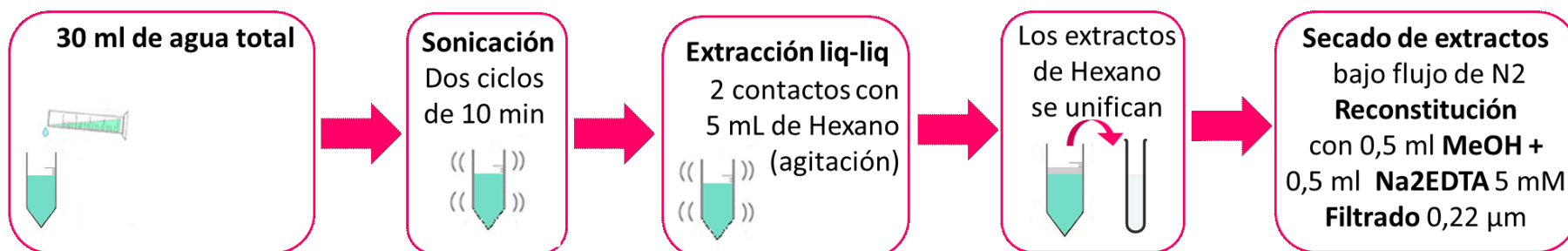
A partir de los estudios sobre extracción, detección y cuantificación, se concluye que:

- La espectrometría de masas es una herramienta robusta, específica y selectiva para el análisis de fármacos veterinarios en muestras ambientales.
- Los sistemas UHPLC-MS/MS presentan ventajas frente a sistemas HPLC-MS:
 - La cromatografía es más rápida, disminuyendo los tiempos de análisis y uso de solventes orgánicos.
 - La detección por MS/MS permite alcanzar límites de detección de más de un orden de magnitud inferiores, a partir del análisis de las transiciones específicas para cada ion precursor.
 - El sistema permite un rango lineal de trabajo ampliado, respetando la repetibilidad de las inyecciones.
- Se ensayaron métodos de extracción de antibióticos desde distintas matrices. A continuación, se resumen los métodos que presentaron mayores ventajas en función de cada matriz:

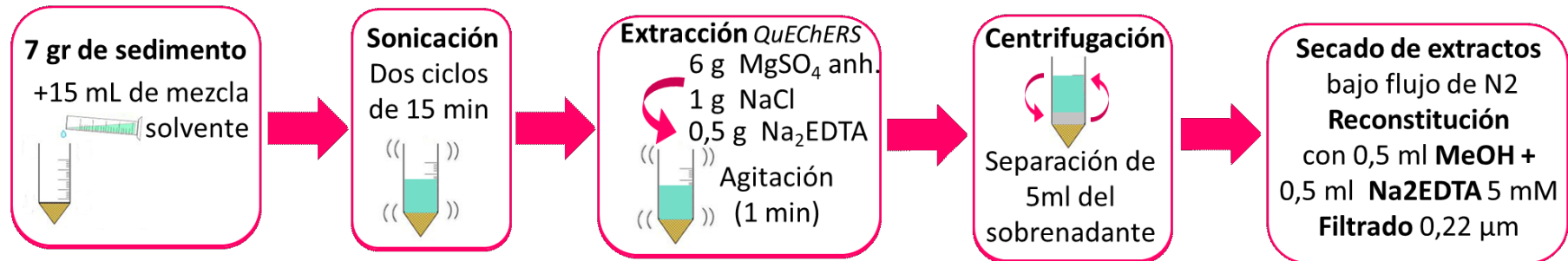
Agua – Fase Soluble: Extracción en fase sólida / Solid-phase extraction (SPE)



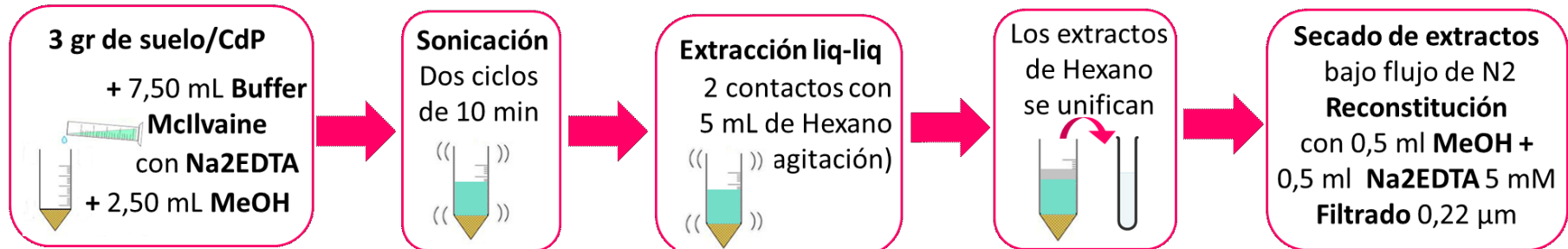
Agua total (fase soluble + fase particulada): Método Alternativo



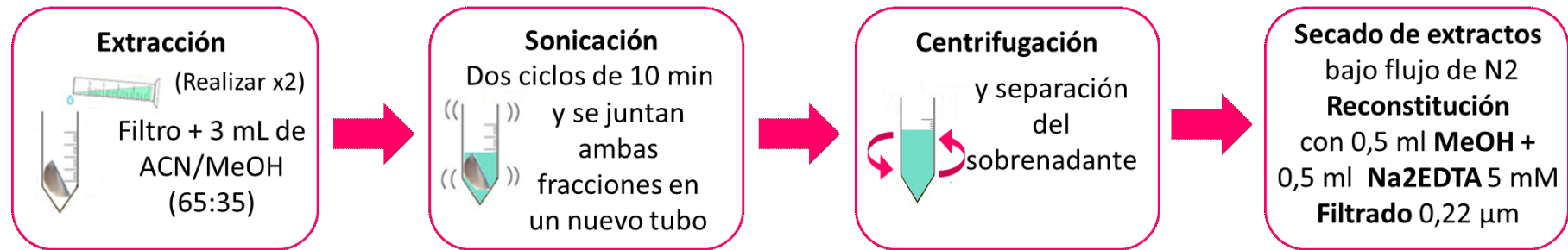
Sedimento: Método QuEChERS



Suelo y CdP: Método Alternativo



Material Particulado: *Extracción asistida por sonicación*



Bibliografia

- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., 2003. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues. 18th Annu. Waste Test. Qual. Assur. Symp. WTQA 2002 - Proc.
- Anderson, C.R., Rupp, H.S., Wu, W.H., 2005. Complexities in tetracycline analysis - Chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1075, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.013>
- Bartelt-Hunt, S., Snow, D.D., Damon-Powell, T., Miesbach, D., 2011. Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. *J. Contam. Hydrol.* 123, 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2010.12.010>
- Biswas, S., McGrath, J.M., Sapkota, A., 2012. Quantification of ionophores in aged poultry litter using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 47, 959-966. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.706564>
- Blackwell, P.A., Holten L??tzh??ft, H.C., Ma, H.P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A.B.A., Kay, P., 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta* 64, 1058-1064. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.05.006>
- Boxall, A.B.A., 2012. New and Emerging Water Pollutants.
- Broekaert, N., Van Peteghem, C., Daeseleire, E., Sticker, D., Van Poucke, C., 2011. Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the determination of ionophoric and synthetic coccidiostats in vegetables. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 3335-3344. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5433-1>
- Cha, J.M., Yang, S., Carlson, K., 2005. Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography with

- ion trap tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1065, 187-198.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.091>
- Cimetiere, N., Soutrel, I., Lemasle, M., Laplanche, A., Crocq, A., 2013. Standard addition method for the determination of pharmaceutical residues in drinking water by SPE-LC-MS/MS. *Environ. Technol.* 34, 3031-41. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.800563>
- Clarke, L., Fodey, T.L., Crooks, S.R.H., Moloney, M., O'Mahony, J., Delahaut, P., O'Kennedy, R., Danaher, M., 2014. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. *Meat Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.01.004>
- Clarke, L., Moloney, M., O'Mahony, J., O'Kennedy, R., Danaher, M., 2013. Determination of 20 coccidiostats in milk, duck muscle and non-avian muscle tissue using UHPLC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A* 30, 958-969.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2013.794306>
- Darwano, H., Vo Duy, S., Sauvé, S., 2014. A new protocol for the analysis of pharmaceuticals, pesticides, and hormones in sediments and suspended particulate matter from rivers and municipal wastewaters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 582-593.
<https://doi.org/10.1007/s00244-014-0007-9>
- Desmarchelier, A., Anizan, S., Minh Tien, M., Savoy, M.C., Bion, C., 2018. Determination of five tetracyclines and their epimers by LC-MS/MS based on a liquid-liquid extraction with low temperature partitioning. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 35, 686-694. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1427894>
- Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2007. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26, 637-646.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.04.004>
- Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2006. Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0444-z>

- Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2005. LC-MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24, 645-657. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.05.005>
- EPA, 2007. Method 1694 : Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water , Soil , Sediment , and Biosolids by HPLC / MS / MS. EPA Method 77.
- European Commission DG-SANTE, 2019. Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis.
- Forbes, M.W., Volmer, D.A., Francis, G.J., Böhme, D.K., 2005. A comparison of data analysis methods for determining gas phase stabilities by CID: Alkali metal complexes of polyether ionophore antibiotics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 779-791. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.01.025>
- Furtula, V., Huang, L., Chambers, P.A., 2009. Determination of veterinary pharmaceuticals in poultry litter and soil by methanol extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 44, 717-723. <https://doi.org/10.1080/03601230903163863>
- Ghosh, C., Shinde, C.P., Chakraborty, B.S., 2012. Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 893-894, 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.012>
- Gross, J.H., 2011. Mass spectrometry: A textbook: Second edition, *Mass Spectrometry: A Textbook: Second Edition*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10711-5>
- Hansen, M., Björklund, E., Krogh, K.A., Halling-Sørensen, B., 2009. Analytical strategies for assessing ionophores in the environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 521-533. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.01.008>
- Hao, C., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P., Solomon, K., 2005. Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray

- ionization/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 505-513.
<https://doi.org/10.1007/s00216-005-0199-y>
- Harris, J. a, Russell, C. a, Wilkins, J.P., 1998. The characterisation of polyether ionophore veterinary drugs by HPLC-electrospray MS. *Analyst* 123, 2625-8.
<https://doi.org/10.1039/a805112g>
- Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Guerrero, C., 2007a. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26, 466-485.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.012>
- Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Guerrero, C., 2007b. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26, 466-485.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.012>
- Huet, A.-C., Bienenmann-Ploum, M., Vincent, U., Delahaut, P., 2013. Screening methods and recent developments in the detection of anticoccidials. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 7733-51. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7035-6>
- Iglesias, A., Nebot, C., Miranda, J.M., Vázquez, B.I., Cepeda, A., 2012. Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3235-3249. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0830-3>
- Kang, D.H., Gupta, S., Rosen, C., Fritz, V., Singh, A., Chander, Y., Murray, H., Rohwer, C., 2013. Antibiotic uptake by vegetable crops from manure-applied soils. *J. Agric. Food Chem.* 61, 9992-10001. <https://doi.org/10.1021/jf404045m>
- Kiehl, D.E., Julian, R.K., Kennington, A.S., 1998. Electrospray ionization mass spectrometry with in-source collision-induced dissociation of monensin factors and related metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 903-910.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19980731\)12:14<903::AID-RCM253>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19980731)12:14<903::AID-RCM253>3.0.CO;2-V)

- Kim, S.C., Carlson, K., 2006. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed. *Water Res.* 40, 2549-2560. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.036>
- Kim, S.C., Carlson, K., 2005. LC-MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24, 635-644. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.04.006>
- Kim, Y., Jung, J., Kim, M., Park, J., Boxall, A.B.A., Choi, K., 2008. Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.03.006>
- Laabs, V., Wehrhan, A., Pinto, A., Dores, E., Amelung, W., 2007. Pesticide fate in tropical wetlands of Brazil: An aquatic microcosm study under semi-field conditions. *Chemosphere* 67, 975-989. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.067>
- Lissemore, L., Hao, C., Yang, P., Sibley, P.K., Mabury, S., Solomon, K.R., 2006. An exposure assessment for selected pharmaceuticals within a watershed in Southern Ontario. *Chemosphere* 64, 717-729. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.015>
- Liu, S., Zhang, C., Campbell, J.L., Zhang, H., Yeung, K.K.C., Han, V.K.M., Lajoie, G.A., 2005. Formation of phosphopeptide-metal ion complexes in liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and their influence on phosphopeptide detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 2747-2756. <https://doi.org/10.1002/rcm.2105>
- Lopes, N.P., Almeida-Paz, F.A., Gates, P.J., 2006. Influence of the alkali metal cation on the fragmentation of monensin in ESI-MS/MS. *Rev. Bras. Ciencias Farm. J. Pharm. Sci.* 42, 363-367. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000300006>
- Lopes, N.P., Stark, C.B.W., Gates, P.J., Staunton, J., 2002. Fragmentation studies on monensin A by sequential electrospray mass spectrometry. *Analyst* 127, 503-506. <https://doi.org/10.1039/b110412h>

- Lopes, N.P., Stark, C.B.W., Hong, H., Gates, P.J., Staunton, J., 2001. A study of the effect of pH, solvent system, cone potential and the addition of crown ethers on the formation of the monensin protonated parent ion in electrospray mass spectrometry. *Analyst* 126, 1630-1632. <https://doi.org/10.1039/b106852k>
- Mac Loughlin, T.M., Peluso, L., Marino, D.J.G., 2017. Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Sci. Total Environ.* 598, 572-580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.116>
- Manisali, I., Chen, D.D.Y., Schneider, B.B., 2006. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future 25, 243-256. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.07.007>
- Matabudul, D.K., Conway, B., Lumley, I., Sumar, S., 2001. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC-MS-MS. *Food Chem.* 75, 345-354. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00174-1)
- Miao, X.S., March, R.E., Metcalfe, C.D., 2003. Fragmentation study of salinomycin and monensin A antibiotics using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 149-154. <https://doi.org/10.1002/rcm.882>
- Moloney, M., Clarke, L., O'Mahony, J., Gadaj, A., O'Kennedy, R., Danaher, M., 2012. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1253, 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.001>
- Mooney, D., Coxon, C., Richards, K.G., Gill, L.W., Mellander, P.E., Danaher, M., 2020. A new sensitive method for the simultaneous chromatographic separation and tandem mass spectrometry detection of anticoccidials, including highly polar compounds, in environmental waters. *J. Chromatogr. A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460857>
- Petrovic, M., Barceló, D., 2007. LC-MS for identifying photodegradation products of

- pharmaceuticals in the environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26, 486-493.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.010>
- Schlusener, M.P., Bester, K., Spiteller, M., 2003. Determination of antibiotics such as macrolides, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 942-947. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1838-9>
- Søeborg, T., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B., 2004. Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water. *Chemosphere* 57, 1515-1524. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.020>
- Stubbings, G., Bigwood, T., 2009. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Anal. Chim. Acta* 637, 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.029>
- Sun, P., Barmaz, D., Cabrera, M.L., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., 2013a. Detection and quantification of ionophore antibiotics in runoff, soil and poultry litter. *J. Chromatogr. A* 1312, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.044>
- Sun, P., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., 2016. Estimation of environmentally relevant chemical properties of veterinary ionophore antibiotics. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 18353-18361. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7029-y>
- Sun, P., Yao, H., Minakata, D., Crittenden, J.C., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., 2013b. Acid-catalyzed transformation of ionophore veterinary antibiotics: Reaction mechanism and product implications. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6781-6789. <https://doi.org/10.1021/es3044517>
- Taylor, P.J., 2005. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007>

- Volmer, D.A., Lock, C.M., 1998. Electrospray ionization and collision-induced dissociation of antibiotic polyether ionophores. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 157-164. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19980227\)12:4<157::AID-RCM134>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19980227)12:4<157::AID-RCM134>3.0.CO;2-M)
- Wickramasekara, S., Hernández-Ruiz, S., Abrell, L., Arnold, R., Chorover, J., 2012. Natural dissolved organic matter affects electrospray ionization during analysis of emerging contaminants by mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 717, 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.019>
- Zhang, X., Li, R., 2018. Variation of antibiotics in sludge pretreatment and anaerobic digestion processes: Degradation and solid-liquid distribution, *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.100>
- Zhang, Z.L., Zhou, J.L., 2007. Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1154, 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.105>
- Zhao, X., Wang, B., Xie, K., Liu, J., Zhang, Y., Wang, Y., Guo, Y., Zhang, G., Dai, G., Wang, J., 2018. Development and comparison of HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS methods for determining eight coccidiostats in beef. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1087-1088, 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.044>
- Zhu, J., Snow, D.D., Cassada, D. a., Monson, S.J., Spalding, R.F., 2001. Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 928, 177-186. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01139-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01139-6)

Capítulo 4 – Estudio de la movilidad de fármacos veterinarios desde su aplicación en suelos agrícolas



4. Estudio de la movilidad de fármacos veterinarios desde su aplicación en suelos agrícolas

4.1. Introducción

En general, en los sistemas de cría avícolas, las excretas se reciben en lo que se conoce como “cama de pollo” (CDP). La CDP es un material que se distribuye sobre el piso de los galpones con el fin de brindar confort y un desarrollo adecuado de las aves, además, puede absorber el agua que se derrama de los bebederos, diluir las excretas, servir como aislante del frío proveniente del piso de los galpones y generar calor por la acción de la degradación de los compuestos orgánicos (Almada et al., 2016; Ritz et al., 2009). En los galpones se pueden adoptar tres tipos de prácticas para el manejo de la CDP: utilizarla una única vez, reutilizarla parcialmente y reutilizarla múltiples veces (Bernhart et al., 2010). En Argentina, según la resolución 106/2013 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) *“las granjas de pollo de engorde deben realizar al menos una (1) vez al año, o bien cada cinco (5) crianzas, un descanso y vacío sanitario que incluya un (1) cambio completo de CDP, limpieza y desinfección profunda de todo el establecimiento”*.

La CDP constituye uno de los tres principales desechos de la producción avícola junto con las excretas y las aves muertas. En Argentina se generan 3.600.000 tn de excreta de pollo anualmente (MINAGRI, 2015; Kellerher et al., 2002). Debido a la cantidad de desecho producido por la industria avícola, se comenzó a adoptar la aplicación de CDP, con o sin compostaje, sobre suelos como una alternativa a los fertilizantes químicos (MINAGRI, 2015). Este uso como enmienda radica en el beneficio para alterar favorablemente las propiedades del suelo, como la disponibilidad de nutrientes para las plantas, el pH, contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico y capacidad de retención de agua (Chan et al.,

2008; Harmel et al., 2009; Bogaard et al., 2013). La dosis agronómica habitualmente aplicadas son entre 5 y 10 tn/ha, según las necesidades nutricionales del cultivo (Almada et al., 2016).

Previo a su aplicación en suelos agrícolas es conveniente que la CDP pase por un proceso de compostaje con el fin de generar un desecho con menor densidad y volumen, estabilizar los nutrientes (menor tasa de mineralización de N, reduciendo la pérdida de NH_3 a través de la volatilización) y reducir los microorganismos patógenos, evitando el contacto de los mismos con los vegetales (Marti et al., 2013; Rotondo et al., 2009). Sin embargo, se desconoce lo que ocurre con otros posibles contaminantes como los AV utilizados en la producción animal. La tasa de degradación de los AV va a variar en función del tipo de antibiótico y las condiciones de compostaje (Kim et al., 2011). Una eliminación insuficiente transforma la CDP en una importante fuente de liberación difusa de AV al ambiente (Baguer et al., 2000; Biswas et al., 2012), incluso en zonas alejadas a los sitios de cría (Aga et al., 2003; Boxall et al., 2002; Halling-Sørensen et al., 2002; Montforts et al., 1999; Tolls, 2001; Vaclavik et al., 2004; Winckler y Grafe, 2001).

La aplicación cíclica, en una misma ubicación, de la CDP puede dar como resultado la exposición continua de bacterias del suelo a residuos de estos compuestos y promover poblaciones resistentes a los mismos. Esta actividad puede traer aparejado potenciales efectos negativos en el ambiente, en especial si los residuos de AV pueden ser movilizados por escorrentía superficial o percolación, llegando a cuerpos de agua como ríos o lagos (Sarmah et al., 2006). Además, los cultivos podrían translocar estas moléculas desde el suelo (Pan, 2017; Dolliver et al., 2007; Broekaert et al., 2012), generando otra vía de exposición humana a través de la alimentación (Tasho and Cho, 2017).

En los últimos años, un número creciente de estudios a nivel mundial proporcionan evidencia de la presencia de los AV tanto en excretas provenientes de la producción animal intensiva como en las distintas matrices ambientales (suelo, sedimentos, cuerpos de agua) (Sarmah et al., 2006; Lukaszewicks et al., 2016). A pesar de ello, no se encuentra suficiente información respecto a cómo se movilizan los AV una vez liberados al ambiente, por lo cual surge la necesidad de incorporar estudios de campo que determinen los fenómenos de percolación, escorrentía superficial, toxicidad para organismos terrestres y acuáticos y el potencial de traslocación por parte los diversos cultivos (Petrie et al., 2014).

Teniendo en cuenta: los volúmenes de excretas y residuos generados en la producción animal (en particular, de camas de pollo); la promoción del uso de estas enmiendas como insumo para la fertilización de los suelos agrícolas; las grandes extensiones de suelos dedicadas a cultivos extensivos e intensivos (hortícolas) en Argentina; y los niveles remanentes de antibióticos en las excretas; se plantearon objetivos de trabajo a fines de estudiar la aplicación de camas de pollo como fuentes de liberación de antibióticos al ambiente. En las siguientes secciones, se discutirán los resultados obtenidos al ensayar en sistemas reales el potencial de movilidad y reparto de tres antibióticos ionóforos monensina (MON), salinomicina (SAL) y lasalocid (LAS) desde camas de pollo. Los ensayos se realizaron aplicando CDP impregnada con antibióticos en suelos agrícolas, sobre los que se simulaban eventos de lluvia en condiciones controladas, a dos tiempos de estabilización de los compuestos en el sólido (24h y 72h). El objetivo del ensayo consistió en determinar la movilidad de los antibióticos luego del evento, incluyendo la penetración en el suelo y su transporte en la escorrentía superficial. Además, se estudió la influencia del tiempo de aplicación previo a la lluvia. Los resultados

obtenidos sirven de base para la discusión de capítulos posteriores, acerca del ingreso y la distribución de estos compuestos en sistemas acuáticos pampeanos.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Ensayo y simulación de escorrentía superficial

Se realizó un ensayo en campo con el objetivo de estudiar la distribución de MON, SAL y LAS proveniente de CDP esparcida sobre suelo agrícola luego de un proceso de escorrentía. En este estudio donde solo se caracterizó el comportamiento de estas moléculas se aplicará la sigla ionóforo, para referirse a ellos. Se simularon eventos de lluvia sobre suelos representativos de la zona de estudio (estación experimental INTA Paraná), en parcelas de campo de 1m x 1m. Sobre dicha superficie se esparció de manera homogénea la CDP siguiendo la práctica convencional de 5 tn/ha (Almada et al., 2016), siendo sobreagregada previamente con ambos ionóforos a distintos niveles de concentración

Para la simulación de lluvia se utilizó un simulador portátil (Figura 26) proporcionado por el INTA (EEA Paraná) Entre Ríos, el cual se ubicó en sentido perpendicular a la superficie del suelo. El simulador consiste en un prisma de hierro metálico, tiene 1,5 m de alto y una base cuadrada de 0,25 m de lado, con paredes acrílicas transparentes que actúan como cortavientos. En la parte superior se ubica un soporte de caja con 49 tubos de polipropileno calibrados, los cuales producen las gotas. La caja presenta una alimentación de agua desde un depósito ubicado en uno de los bordes de la estructura y el mismo se encuentra graduado en milímetros de agua que se aplican a los microplots (goteros). La base del depósito puede

variar de altura, proporcionando diferentes presiones para formar las gotas, según los objetivos del ensayo.

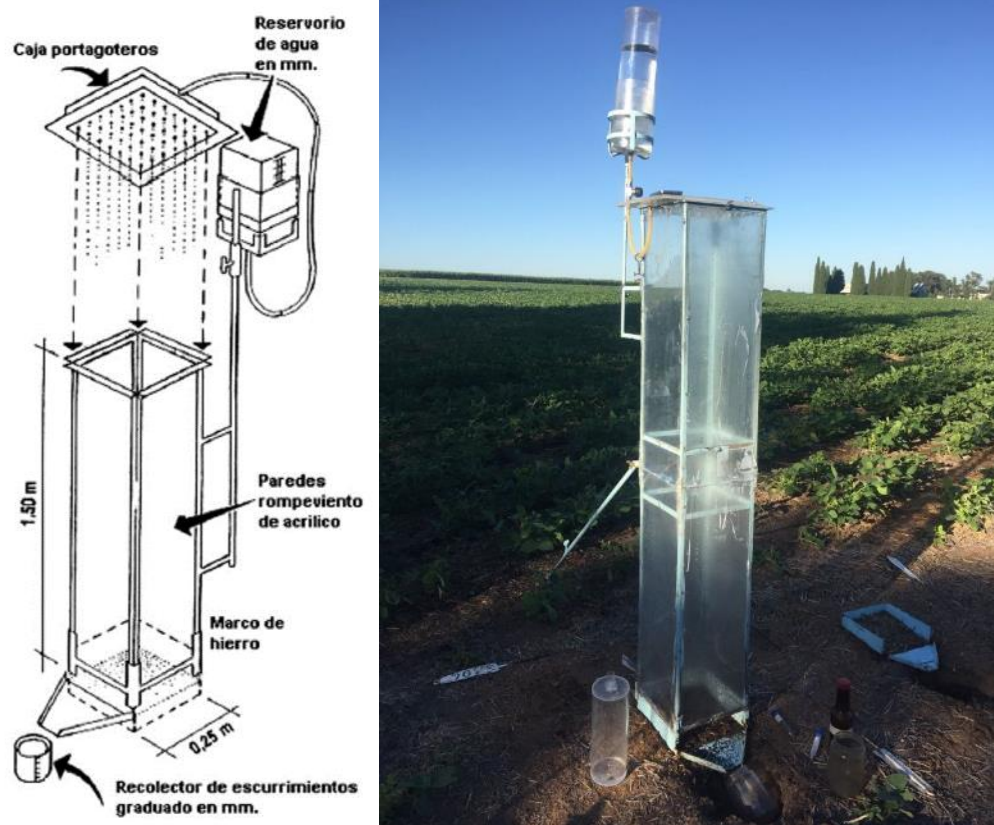


Figura 26. Esquema (izquierda) e imagen (derecha) del simulador de lluvia portátil (Sasal et al., 2015).

En posición de trabajo, el dispositivo está fijado a un bastidor de hierro (Figura 27), que previamente se acciona al suelo. El microplot define un área de 0,25m x 0,25m en la cual se realizan las mediciones, con la base del simulador centrado en las parcelas de 1m x 1m (Figura 28), tratadas con las enmiendas. La esorrentía se recibe a través de un embudo en un recipiente de plástico graduado en milímetros en la parte inferior del bastidor.



Figura 27. Sistema de recolección de escorrentía.



Figura 28. Parcela de trabajo de 1m x 1m para la simulación.

Este dispositivo permite aplicar una intensidad de lluvia constante entre 10 y 130 mm/h en cada sitio de ensayo (Sasal et al., 2015).

Para la simulación se dispusieron 9 parcelas linderas de 1m x 1m, en las cuales se distribuyeron las distintas muestras (sin y con distintos niveles de dopaje de los ionóforos) de forma aleatoria (Figura 29 y Figura 30). Las mismas consistieron en un blanco (Bco), una

concentración C1 (0,1 mg/kg) y una concentración C2 (1 mg/kg), a su vez, cada una se hizo por triplicado dando lugar a los rótulos C1-1,2,3; C2-1,2,3 donde el primer subíndice indica el tratamiento de concentración y el segundo subíndice la réplica.



Figura 29. Parcelas linderas utilizadas en la simulación.



Figura 30. Esquema con la distribución aleatoria de las CDP en las parcelas.

El blanco consistió en CDP provista por el EEA-INTA, proveniente de un criadero avícola que articula con este último. Por otro lado, para las muestras a dos niveles de concentraciones de MON y SAL (C1 y C2), se procedió a dosificar estas moléculas por el método de impregnación (Kay et al., 2005) en dos fracciones del sustrato avícola. Para ello se generaron dos núcleos sólidos de concentración 2 y 20 mg/kg por impregnación de 500 gramos de CDP con los ionóforos portados en etanol (12,9 mg MON y 15,3 mg SAL en 11 ml de etanol), luego se

dejaron al aire a 25°C para la eliminación del solvente por evaporación durante 24hs previas al ensayo. Posteriormente, se mezclaron 60 gramos de los núcleos con 1110 gramos de CDP blanco tanto para la C1 como la C2, estas mezclas fueron preparadas de manera independiente para cada réplica de cada nivel de concentración de trabajo, previo mezclado para lograr una dilución adecuada de los núcleos en la CDP blanco. Cada uno de estos lotes de trabajo fueron analizados a fin de determinar la concentración inicial de trabajo.

Para la simulación se estableció una lluvia de 120 mm/h, debido a que valores menores extendían el tiempo de realización del ensayo impidiendo la ejecución en el mismo día para todas las réplicas. Con este régimen de lluvias se logró un tiempo de corrida de aproximadamente 2 h por parcela, el cual resulta ser adecuado ya que es insuficiente para que ocurran procesos de degradación por hidrólisis de los compuestos estudiados (Sun et al., 2013). Para la lluvia se utilizó agua reconstituida según APHA, 1998.

4.2.2. Toma de muestras

4.2.2.1. Aguas

Las muestras de agua de esorrentía se tomaron a intervalos regulares de 5 minutos y en tres momentos del ensayo: inicio, régimen y fin. La inicial, fue considerada como el primer goteo constante sobre el colector de esorrentía; como criterio de estabilización del sistema y fin de ensayo se consideraron tres lecturas de volumen de esorrentía equivalentes y en esa instancia se dio por finalizado el ensayo donde se tomó la muestra final. En todos los casos, las muestras de agua total fueron colectadas de manera puntual en botellas de vidrio color caramelo de 500 ml, a las cuales se agregó 5,00 ml de MeOH para lograr una concentración

de 1% y se conservaron en frío (4°C) hasta su traslado al laboratorio. Conjuntamente, se colectaron muestras de agua total en botellas plásticas de 500 ml para posterior análisis de parámetros de calidad y nutrientes. Las muestras se almacenaron en freezer a -20°C hasta el momento del análisis.

4.2.2.2. Suelos y CDP

Al finalizar la simulación de lluvia, se tomó muestra de la CDP afectada a la lluvia y el suelo complementario de manera de estudiar la movilidad vertical sobre las matrices sólidas como consecuencia del ingreso de agua por lluvias. Este muestreo se realizó a nivel superficial (2 cm) y subsuperficial (2 a 20 cm), ambos con barreno manual (Figura 31) según Feng y Thompson (1990), adaptando a las dimensiones del ensayo propuesto. Las muestras fueron unificadas y homogenizadas en campo, conservándose en frío (4°C) hasta su traslado al laboratorio. Las muestras, una vez en el laboratorio, se almacenaron en freezer a -20°C hasta el momento de su análisis.



Figura 31. Barreno manual con el que se realizó el muestreo a nivel superficial (2 cm) y subsuperficial (2 a 20 cm).

Esta información obtenida aporta conocimiento base respecto de la dinámica ambiental de las moléculas en un escenario particular considerando las características de suelos regionales y dosis reales de uso a campo, tal que puedan proponerse modelos de compartimentalización en las condiciones ensayadas

4.2.3. Análisis fisicoquímico

4.2.3.1. Aguas

Sobre las muestras acuosas se determinaron parámetros de calidad y nutrientes mediante técnicas estandarizadas de análisis (APHA, 1998). Se midió *in situ* pH (4500H⁺-B), Conductividad (2510-B), O₂ disuelto (4500 O₂-G) y temperatura (2550-B) mediante un equipo portátil multapamétrico Lutron[®]. En laboratorio se determinó Demanda Química de Oxígeno (5220-D), fósforo reactivo soluble (4500P-C) y sólidos totales (2540-B). Todos estos parámetros se midieron con el fin de evaluar la movilidad de distintos materiales y describir la influencia y/o relación de estos factores con la dinámica de los ionóforos, tal como se han evaluado para otros contaminantes como glifosato con estos dispositivos y diseño de trabajo (Sasal et al., 2015).

Para el análisis de antibióticos, se realizaron extracciones del agua total mediante la metodología alternativa derivada de Sun et al. (2013), presentado en el capítulo 3 del presente trabajo (Sección 3.10.4).

4.2.3.2. Suelos y CDP

Se determinaron peso seco a 105°C (APHA, 1998) y pérdida por ignición (LOI) a 550°C (Heiri et al 2001), en las muestras de suelo y CDP. Este último se calcino con mechero previamente a colocarlo en la mufla.

Para la determinación de antibióticos, las muestras de suelo y CDP fueron extraídas aplicando la metodología adaptada de Sun et al. (2013), como se mencionó anteriormente (Sección 3.11.2).

4.2.4. Análisis instrumental

El análisis químico cuantitativo de los analitos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Las condiciones cromatográficas se describen en el Capítulo 3 (Sección 3.7) (Alonso et al., 2019).

4.2.5. Reactivos y solventes

Todos los solventes utilizados en los análisis químicos y cromatográficos fueron de grado HPLC y las sales de grado analítico (JT Baker-Mallinckrodt Baker Inc., EE. UU.). Se utilizó un sistema de purificación de agua Sartorius Arium™ (Sartorius AG, Gotinga, Países Bajos) para obtener agua ultrapura. Los compuestos estudiados (MON, SAL y LAS) se compraron de Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU. Las soluciones madre individuales de cada ionóforo se prepararon inicialmente en metanol (1,00 g/L) y luego se diluyeron adicionalmente para la preparación de las soluciones estándar de trabajo mixtas (Zhang y Zhou, 2007).

4.2.6. Procedimientos de trabajo para el aseguramiento de resultados

Tal como se mencionó en apartados anteriores la falta de estándares isotópicos para estas moléculas, demanda del uso de distintas etapas que permitan asegurar los procedimientos del análisis químico. Para ello se utilizaron blanco de reactivos y muestras duplicadas. Adicionalmente, se realizaron análisis de muestras sobreagregadas, y se analizaron blancos de muestras de las diferentes matrices para evaluar la recuperación analítica y la supresión iónica consecuencia del análisis por LC-MS (Taylor, 2005). Los criterios analíticos aplicados fueron la relación de las áreas cromatográficas de dos transiciones de masas y los tiempos de retención, tanto en los estándares como en las muestras. La confirmación de los resultados positivos se realizó calculando las relaciones de área de la transición de cuantificación (Q) y las transiciones de confirmación, discutidas en la Sección 3.7 (Alonso et al., 2019).

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Ensayo de simulación de lluvia

Los ensayos realizados permitieron caracterizarla movilidad tanto vertical (percolación) como horizontal (escorrentía superficial) de los ionóforos desde la CDP esparcida en suelos de uso agrícola a partir de un evento de lluvia, siendo detectados a niveles cuantificables en todas las matrices estudiadas. En las secciones siguientes se analizarán y discutirán los resultados obtenidos en cada matriz (Tabla 18), las correlaciones halladas entre los antibióticos detectados en cada una y otros parámetros involucrados, y por último una interpretación global del ensayo.

Tabla 18. Concentraciones de Ionóforos detectados a niveles cuantificables en todas las matrices estudiadas en los tratamientos temporales realizados.

Tiempo Horas	Farmáco	Tratamiento	[CDPi] ng/g	[Suelo 0-2cm] ng/g	[Suelo 2-20cm] ng/g	[Agua escorrentía] ng/L
24	MON	bco	<LD	12±18	0,3±0,3	27±14
		C1	8±3	1,5±0,9	0,16±0,04	119±51
		C2	35±9	39±44	0,4±0,2	1450±1501
	SAL	bco	2110±1709	244±137	4±2	3017±762
		C1	951±681	125±77	3±1	4043±1845
		C2	407±197	311±254	5±2	10898±8166
	LAS	bco	<LD	<LD	<LD	<LD
		C1	18±3	<LD	<LD	<LD
		C2	167±79	26±22	<LD	20±14
72	MON	bco	13±22	0,8±1,4	0,2±0,1	47±9
		C1	21±17	3±4	0,7±0,4	105±39
		C2	109±88	8±8	1,0±0,6	733±382
	SAL	bco	329±353	61±25	1,5±0,5	3880±1679
		C1	528±249	103±69	2±1	3281±1100
		C2	813±570	70±27	3±2	4495±1390
	LAS	bco	1±2	<LD	<LD	<LD
		C1	20±16	<LD	0,1±0,2	4±2
		C2	53±45	4±2	0,02±0,03	40±14

4.3.1.1. Carga inicial en las CDP

Las concentraciones de ionóforos reales en la CDP inicial se presentan en la Tabla 19, consecuencia de los tratamientos de preparación en laboratorio. A partir de la medición se pudo determinar que, las CDP utilizadas presentaron concentraciones de MON y SAL cuantificables previas al tratamiento de sobreagregado. En especial para SAL, es notable las concentraciones mayores, respecto a los otros antibióticos observadas, las cuales enmascararon el primer nivel de sobreagregado utilizado según los análisis estadísticos aplicados a cada tratamiento. Estos niveles de base de SAL y MON son del orden de los reportados por Furtula et al. (2009) para CDP provenientes de granjas comerciales de Canadá con rango en 10-11000 ng/g donde la presencia de SAL fue significativamente superior a la observada para MON. Ambos compuestos presentan baja degradación en las CDP, siendo

persistentes por más de tres años (Biswas et al., 2012) e incluso siendo MON menos afectada que SAL (Dolliver y Gupta, 2008; Sun et al., 2014). Es posible que la diferencia en los niveles se deba a una mayor proporción de SAL en el suministro de alimento durante el período de cría, previo a la colección de las CDP. Dado que operativamente no se pudo analizar con anterioridad la CDP inicial, los niveles posteriormente ensayados para SAL (C1 y C2), y MON (C1) fueron *enmascarados* por las concentraciones previas, ya que no se observaron diferencias significativas entre tales tratamientos y los “blancos”. Este resultado pone en evidencia la importancia de caracterizar la CDP a fin de establecer la línea de base de las concentraciones de ionóforos que seguramente varíen en cada establecimiento, y además presenta la dificultad de poder contar con matrices de esta naturaleza y complejidad libre de antibióticos para conducir ensayos dentro de los rangos reales de concentración por el método del impregnado. Además, debido a las diferentes combinaciones y dosis de fármacos utilizados en la industria avícola en otras áreas, las concentraciones de residuos en CDP pueden variar geográficamente (Furtula et al., 2009) y este tipo de variables deben ser consideradas en el diseño del ensayo.

Tabla 19. Concentraciones de ionóforos en las camas aplicadas en el ensayo.
(C1 nominal= 100 ng/g, C2 nominal=1000 ng/g).

Analito	Muestra n=3	[CDPi] ng/g			
		Media \pm SD	Min	Max	Mediana
SAL	Bco	1219 \pm 1473	86	3375	450
	C1	739 \pm 514	287	1716	619
	C2	610 \pm 441	195	1379	513
MON	Bco	9 \pm 15	\leq LD	38	3
	C1	17 \pm 12	5	39	14
	C2	102 \pm 66	7	163	119
LAS	Bco	\leq LD	\leq LD	4	\leq LD
	C1	19 \pm 10	3	34	20
	C2	110 \pm 85	9	253	98

En concordancia con lo discutido para SAL y MON, los valores de LAS, presentan diferencias significativas entre los 3 tratamientos, al igual que para la C2 de MON respecto al blanco, a partir de lo cual se harán inferencias posteriores. Los valores de concentración cuantificados para LAS son inferiores a lo esperado a los sobreagregados. Es importante destacar la heterogeneidad de la matriz, compuesta por cascaras, virutas y sólidos finos, que afectan la dispersión y la distribución de los antibióticos en toda la muestra (Furtula et al., 2009). Otros factores como la estabilidad de los compuestos también pueden afectar la presencia de estos compuestos, desde la preparación de las CDP, hasta su medición, siendo LAS una molécula sensible a la fotodegradación (Bohn et al., 2013) . La variabilidad entre replicas se encontró en un rango de 33-81% en la concentración de ionóforos en CDP, resultado que es consecuente con el CV de 23-91% reportado por Furtula et al. (2009) para este mismo tipo de estudios. En caracterizaciones de interés agronómico es frecuente los altos valores en los CV como consecuencia de las respuestas variadas de los sistemas naturales frente a acciones antrópicas para estimular las respuestas de los mismos (Pereira Ferreira et al., 2016; Mora y Arriagada, 2016).

4.3.1.2. Movilidad por procesos de escorrentía superficial

A partir de la falta de ajuste de normalidad de los datos, se realizaron análisis estadísticos comparativos (Kruskal-Wallis) de las concentraciones de ionóforos en el agua de escorrentía en relación a los tratamientos y al tiempo estudiado. No se observó interacción entre ambas variables, por lo que continuó el estudio independiente de las mismas. Para SAL en ambos tiempos de ensayo, las escorrentías a C1 y C2 no se diferenciaron del blanco. Por otra parte, se observaron mayores concentraciones en la escorrentía de C2 para MON a 24hs y 72hs. En

cuanto a LAS, no se detectaron concentraciones en el tratamiento control (blanco), y el tratamiento C2 difirió significativamente de los dos restantes para los ensayos a 24hs y 72hs. El tratamiento C1 de LAS solo presentó concentraciones detectables en agua a las 72hs. En el caso de LAS, se observa que a mayores concentraciones del compuesto en la CDP (tratamientos), la concentración en la escorrentía aumenta en respuesta, indicando mayor movilización.

	% de PÉRDIDA		
	MON	SAL	LAS
 <p>24h</p> <p>ESCORRENTIA</p> <p>PERCOLACION</p>	3-31	1-17	0-1,57
	0,4-18	0,7-7	-
 <p>72h</p> <p>ESCORRENTIA</p> <p>PERCOLACION</p>	1-22	2-14	0,79-3,47
	2-38	1-9	1,9

Figura 32. Resumen de los % de perdida por movimiento vertical/horizontal.

En la Figura 32 se pueden observar los porcentajes de movilización de LAS, MON y SAL por procesos de escorrentía superficial para los dos tiempos de estabilización ensayados (24hs y 72hs). Para el cálculo, se realizó el cociente de la masa de antibiótico en el agua de escorrentía (se obtuvo respecto al volumen total de escorrentía colectado en la duración del ensayo), y

la masa inicial de antibiótico cuantificada en cada CDP (en relación a la masa utilizada en el ensayo en la superficie de escorrentía de 0,0625 m²).

Los porcentajes de movilización de MON por escorrentía superficial variaron entre 3-31% y 1-22%, a las 24hs y 72hs respectivamente, sin presentar diferencias significativas entre ellos. En cuanto a SAL, los porcentajes de movilización por escorrentía superficial variaron entre 1-17% y 2-14%, a las 24hs y 72hs. Es importante notar que las muestras colectadas corresponden a agua total, involucrando tanto la fracción soluble como particulada, dado que el reparto en la escorrentía no fue parte de los objetivos ni del diseño experimental. Las pérdidas totales por escorrentía reportadas en la literatura para MON son variables y por ejemplo van desde valores como 0,26% – sumando la fracción soluble y particulada (Kim et al., 2010a), rangos de 1-5% para fracción soluble (Doydora et al., 2015) o máximo de 2% para igual fracción (Dolliver y Gupta, 2008). Para explicar tal diferencia entre la literatura y lo obtenido experimentalmente se puede asignar que el mayor caudal de precipitación utilizado en este trabajo pueda haber favorecido un mayor arrastre de material, transportando así mayor cantidad de antibióticos. Sin embargo, Doydora et al. (2015) reporta haber registrado pérdidas superiores a otros trabajos, a pesar de tener menor caudal de lluvia. Por otra parte, la forma de aplicación de los compuestos en las parcelas puede favorecer la adsorción sobre el suelo, disminuyendo la movilidad en la escorrentía. La aplicación de un spray con antibióticos directamente sobre el suelo (Kim et al., 2010a) puede ampliar el contacto entre estos compuestos y las partículas de suelo, favoreciendo los equilibrios de sorción, a diferencia de la aplicación de los mismos desde la CDP (Doydora et al., 2015). Esto pone de manifiesto que la vía de ingreso y la composición característica de la CDP pueden tener un rol determinante en los porcentajes de fármaco que se podrían movilizar por procesos de

escorrentía superficial y sobre estos resultados se abre un espectro de variables que pueden ser estudiadas a futuro sobre estos sistemas.

Particularmente para LAS, se registraron pérdidas de entre 0,05-3,47%. Estos valores son comparables a los estudios mencionados anteriormente para los otros antibióticos (SAL y MON). Estas pérdidas son significativamente inferiores a las observadas para MON y SAL y si bien la diferencia entre las pérdidas por movilidad es significativa entre tratamientos a distintas concentraciones, no hay datos previos específicos sobre la movilidad de LAS que permitan comparar con otros casos. Una hipótesis que se propone es que los antibióticos sobreagregados se adsorben sobre diferentes componentes de la matriz (cuya heterogeneidad puede implicar distintos repartos con la escorrentía según se hable de la naturaleza de los materiales auxiliares como cáscara, viruta o partícula de excremento) respecto a las fracciones de SAL y MON residuales en la CDP inicial, sin embargo, en función de la información generada no se pueden elaborar conclusiones apropiadas. Una propuesta que surge de estos resultados es la de evaluar la distribución de los antibióticos en las distintas fracciones de la CDP, separando la matriz por tamaño de partícula. Adicionalmente podrían realizarse estudios de sorción en laboratorio (isotermas) sobre cada uno de los componentes de estas mezclas y establecer modelos predictivos que describan relaciones entre composición y retención/movilidad frente a procesos de escorrentía

Estos resultados ponen en relevancia la movilidad de los ionóforos por procesos de escorrentía superficial, a partir de la aplicación de CDP como enmienda orgánica en suelos de uso agrícola. Incluso independientemente de las concentraciones ensayadas y su comportamiento en el tiempo, la movilidad se registró desde los sustratos “blancos” consistentes en sistemas reales con concentraciones iniciales relevantes de estos

contaminantes emergentes y estabilizados. E siendo así la escorrentía una fuente de ingreso de fármacos veterinarios en cuerpos de agua superficial (Alonso et al., 2019; Hao et al., 2005; Kim y Carlson, 2006; Lissemore et al., 2006).

4.3.1.3. Movilidad por procesos de percolación

No se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos temporales para la movilización vertical (Figura 32), indicando que al igual que con la escorrentía superficial, estos fenómenos de movilidad no se ven afectados si se dejan estabilizar 24hs o 72hs. Posiblemente los procesos que puedan afectar la movilidad (mayor sorción, degradación biótica y abiótica) se vuelvan determinantes a tiempos superiores, tal como indica, Doydora et al. (2015) que encuentra diferencias en las concentraciones movilizadas luego de dos semanas post-aplicación de CDP.

Para estimar el porcentaje de movilización en la columna vertical, dado que no se determinó la masa de suelo en toda la parcela, se calculó la relación entre las concentraciones obtenidas en la fracción de suelo entre 2-20 cm, respecto a la fracción de suelo superficial a 2 cm. Para MON los porcentajes de movilidad, comprendidos como la cantidad presente en profundidad respecto a la superficie, variaron entre 0,4-18% y 2-38%, a las 24hs y 72hs respectivamente. Kim et al. (2010) reporta que MON se movilizó en la columna de suelo hasta una profundidad de 30 cm, obteniendo un porcentaje máximo de 36,1% a una profundidad de 20 cm. Los valores experimentales del presente trabajo se encuentran dentro de lo reportado, confirmando la movilidad vertical de este compuesto en suelos agrícolas. En cuanto a SAL, los porcentajes de movilización en suelo (al igual que para MON, entre las fracciones de 0-2 y 2-

20 cm) variaron entre 0,7-7% y 1-9% a las 24hs y 72hs respectivamente. Se observa un menor rango de movilidad que para MON, si bien la dispersión de los datos no indica diferencias entre ambos. No se detectó LAS en la capa superficial de suelo a las 24hs ni a las 72hs para la C1, mientras que si se hallaron valores cuantificables en el tratamiento C2. A las 24hs, las concentraciones de LAS son significativamente superiores que las halladas a 72hs, resaltando una pérdida del compuesto asociado a su menor vida media en suelo de 1,4 d respecto a los otros compuestos (Sassman y Lee, 2007). En la capa de 2-20 cm, solo se detectó LAS a las 72hs, obteniendo un solo “porcentaje de movilidad” calculable de 1,9%. Vale destacar que además de ser más susceptible a fenómenos de degradación por hidrólisis y fotólisis, LAS presenta mayores valores de K_d y K_{oc} que MON en suelos ensayados a escala laboratorio (Sassman y Lee, 2007), determinando una mayor prevalencia por retenerse al suelo respecto a MON.

4.3.2. Correlaciones temporales

En el primer tiempo de estabilización ensayado (24hs) se obtuvo que la concentración de MON en el agua de escorrentía correlacionaba positivamente con la concentración de LAS y SAL, indicando que las moléculas se movilizan de manera equivalente, posiblemente asociadas al movimiento de material arrastrado por la lluvia. LAS no presentó otras asociaciones. Además, se observó que tanto MON como SAL correlacionaron positivamente con la conductividad y el fósforo reactivo soluble, evidenciando el rol del agua en la movilización de materiales desde las CDP de manera concurrente con el ingreso de los ionóforos a la escorrentía. Diversos autores han demostrado que a cortos intervalos (1h a 24hs) entre la aplicación de la enmienda y la simulación de la lluvia, ocurren las mayores

pérdidas de materiales y nutrientes, como el nitrógeno y fósforo (Sasal et al., 2015; Edwards y Daniel, 1993), sin embargo, no se observaron diferencias entre las 24hs y 72hs de aplicación de la enmienda. Posiblemente se requieran más de 72hs para ver una disminución en la pérdida por escorrentía, tal como se mencionó anteriormente para los antibióticos. Kim et al. (2010) y Davis et al. (2006) realizaron simulaciones variando la intensidad de lluvia en función del tiempo, obteniendo que los mayores porcentajes de pérdida de antibióticos movilizados por escorrentía ocurren en el intervalo inicial, donde se llega a una intensidad máxima de 115 mm/h. La intensidad utilizada en el presente trabajo fue de 120 mm/h, con lo cual se podría esperar que los resultados hallados indiquen una condición de pérdidas “máximas”.

En el segundo tiempo de estabilización ensayado se obtuvo que, si bien se movilizó MON por escorrentía superficial, su concentración en agua solo correlacionó con la concentración de LAS. Para ambos casos, no se observó asociación con otros de los parámetros determinados. Por otra parte, la concentración de SAL mantuvo las correlaciones con los parámetros fisicoquímicos, pero no con la concentración de MON. Esta falta de relación entre las concentraciones podría deberse a que, 72hs después de la impregnación de los antibióticos en el sustrato avícola y su posterior aplicación al suelo, parte de la masa inicial dosificada de MON se haya degradado (Carlson y Mabury, 2006; Schlüsener y Bester, 2006), mientras que no hubo modificaciones para SAL. Asimismo, SAL (en agua) fue el único ionóforo que mantuvo una correlación positiva con la concentración de fósforo reactivo soluble en los dos tiempos ensayados. Este comportamiento podría deberse a que, como demostraron Ramaswamy et al. (2011), los aniones fosfatos tienen la capacidad de desorber SAL desde el suelo.

En las condiciones estudiadas, si bien no se han detectado diferencias en varias de las matrices estudiadas para MON, la estabilización podría estar jugando un rol importante en su

distribución, siendo esta más afín al transporte de material en una primera fase de incorporación al suelo (se observan correlaciones con otros parámetros en aguas), para luego movilizarse hacia capas más profundas del mismo (no se ven correlaciones con parámetros del agua, y comienzan a verse concentraciones en la capa de suelo 2-20 para LAS).

4.3.3. Movilidad y persistencia de los ionóforos

En función de los resultados discutidos, se detectan 3 posibilidades para los ionóforos, una vez aplicados mediante CDP a los suelos, los cuales se resumen en la Figura 32:

- Persistencia en el sistema suelo/CDP: las concentraciones remanentes tanto en la CDP post-lluvia como en suelo en la capa superficial (a 2 cm), indican que parte de los antibióticos incorporados al sistema permanecen adsorbidos a la matriz sólida superficial, en la que se han visto que pueden permanecer hasta más de 36 días (Schlusener y Bester, 2006).
- Movilidad en la escorrentía: una fracción de los antibióticos incorporados, se moviliza luego de una lluvia por escorrentía, con pérdidas de hasta 31%. Esta escorrentía puede alcanzar cuerpos de agua superficial cercanos, actuando como fuente difusa de ionóforos a los ecosistemas acuáticos. La consecuente distribución de los antibióticos una vez que alcanzan los sistemas acuáticos se discutirá en el capítulo 5 del presente estudio y será dependiente del cuerpo de agua receptor.
- Movilidad en la columna de suelo: por último, una parte de los antibióticos que se incorporan al suelo, pueden moverse mediante distintos fenómenos de reparto (Kim et al., 2010b) hacia capas profundas de suelo. La movilidad vertical y la posibilidad de detectarse en fracciones de suelo correspondiente a la rizosfera, ponen a estas moléculas en una situación de ser potencialmente traslocadas en cantidades variables por los diferentes cultivos (Tasho, 2016). Diversos autores han demostrado

que cultivos como el maíz, cebolla verde, repollo, trigo, lechuga y papa incorporaron fármacos de uso veterinario (Kumar et al., 2005; Dolliver et al., 2007; Grote et al., 2007; Pan y Chu, 2017) debido a la práctica agrícola de utilización de enmiendas orgánicas de origen animal, lo cual conlleva a que el consumo de estos vegetales constituya una vía de exposición para humanos. Por otra parte, la movilidad vertical constituye otro potencial riesgo, tanto para el ambiente como para la salud humana, debido a que puede contaminar acuíferos (Alonso et al, 2018; Bartelt-Hunt et al., 2011; Watanabe et al., 2008). Esta preocupación motivó el estudio de la presencia de antibióticos en la capa freática de una zona modelo de actividad productiva, junto a vecinos de la comunidad de Saladillo, a fines de evaluar el alcance de estos compuestos en un escenario ambiental de cría animal intensivo bajo el uso de alimentación basada en ionóforos. Los detalles del estudio y los resultados se presentan en la siguiente sección.

4.3.4. Estudio de la movilidad de antibióticos hacia la capa freática.

Como se ha discutido anteriormente, las fracciones no metabolizadas de los ionóforos suministrados en el alimento son liberadas al ambiente a través de las excretas animales desde donde pueden movilizarse a través de la percolación de estos compuestos hasta alcanzar cuerpos de agua subterránea; estudios previos indican la presencia de estos compuestos en agua subterránea entre 2 y 5 metros (Watanabe et al., 2008).

La zona de estudio se caracteriza por la presencia de un espacio de producción bovina intensiva (*feedlot*) a 20 km de Saladillo (Bs. As., Argentina), en cercanías a galpones de producción avícola, es decir se corresponde con un escenario mixto. Los sistemas se encuentran lindantes a un canal colector con desembocadura en el A° Saladillo. Estudios previos en la zona concluyeron que la actividad pecuaria intensiva, provoca cambios en la

calidad del agua freática, aportando a la misma electrolitos que en algunos casos pueden exceder los límites permitidos para el consumo humano. La concentración de nitratos no excedió, en su mayoría, los parámetros establecidos como no apto para consumo humano por el CAA, pero puede influir en el balance normal de otros elementos, como el Fósforo. El mismo se presenta en concentraciones elevadas respecto al contenido basal para ambientes no eutrofizados. En definitiva, el aumento de la conductividad, la concentración elevada de Fósforo, disminuyen la calidad del agua subterránea, aguas abajo del emprendimiento, y son indicadores de los efectos que ocasiona este tipo de actividad (Zarragoicoechea et al., 2019).



Figura 33. Mapa de la localización de los freáticos monitoreados y sitios de referencia en el área.

El agua freática, en muchas ocasiones, se constituye en el suministro a la población rural y al ganado. Sobre la base de estos estudios particulares sobre la alteración de algunos parámetros de calidad de aguas, que demuestran la incidencia de la actividad sobre el sistema freático y dada la escasa información sobre el impacto de esta actividad en la zona, se considera relevante para esta tesis profundizar sobre el potencial alcance que pueden tener

los antibióticos veterinarios aplicados en la producción animal en la superficie sobre el agua subterránea (Figura 33).

El objetivo de esta sección fue estudiar el potencial alcance de ionóforos a aguas subterráneas en una zona modelo de producción animal mixta de la región pampeana. El trabajo se realizó en colaboración con el Lic. Pablo Zarragoicoechea, en el marco de su tesis de maestría titulada “Efectos del engorde a corral sobre el agua freática, en el Partido de Saladillo. Estudio de un caso” enfocada en parámetros generales de calidad. Se realizaron 3 monitoreos (uno por año) desde 2016 a 2018. El primer monitoreo se realizó con el *feedlot* en actividad, y se repitió durante los dos años siguientes con el establecimiento ya fuera de servicio, pero sin acciones de remediación o modificación de los suelos. Se evaluó la presencia de MON, SAL y LAS en agua de 4 pozos freáticos circundantes a un sistema de engorde a corral. Se consideraron 2 sitios aguas arriba y dos sitios aguas abajo (Figura 34).

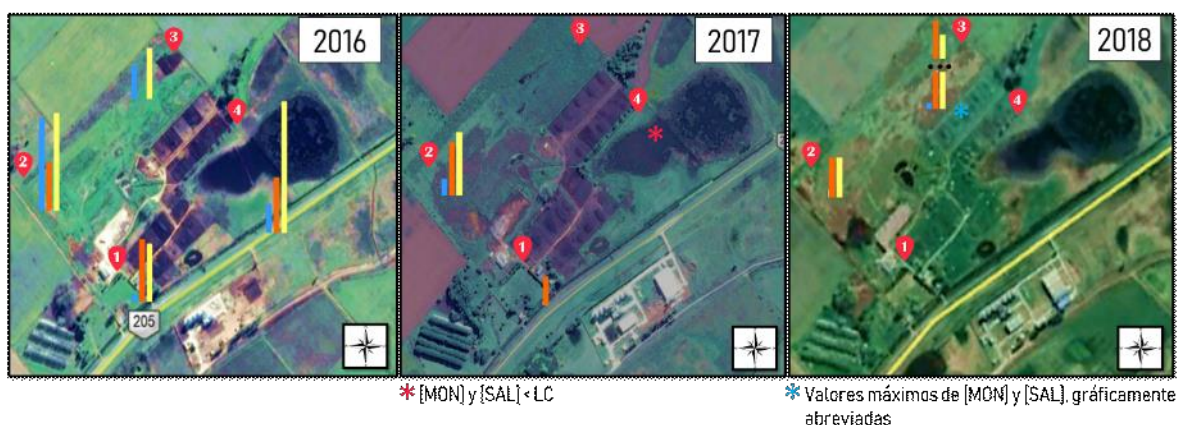


Figura 34. Variación anual de las concentraciones de ionóforos en los pozos.

Dada la naturaleza del acuífero y para lograr la mayor sensibilidad se para el tratamiento de las muestras se optó por el método de SPE que, como se discutió anteriormente (Sección 3.10.4). A fines del aseguramiento de los resultados las muestras fueron tomadas por

duplicado con el agregado respectivo de conservantes, tal como fuera descripto en la Sección 4.2.2.1.

Tabla 20. Datos obtenidos del muestreo en 3 años consecutivos de los freatímetros.

Muestreo	Total	2016	2017	2018
Detección al menos 1 [ionóforo] > LC	67 %	100 %	50 %	50 %
Detección de los 3 [ionóforo] > LC	42 %	75 %	25 %	50 %
IONÓFORO más detectado	SAL	LAS-SAL	MON	MON-SAL
Carga ionóforo promedio (ng/L) \pm SD	104 \pm 66	122 \pm 62	52 \pm 48	120 \pm 99
Carga ionóforo máxima (ng/L)	198	198	86	190

En la Figura 34 y en la Tabla 20, se observa que el 67% de los muestreos (n=12) se observó la presencia del al menos 1 ionóforo, mientras que en el 42% de las mismas se observó la presencia conjunta de los 3 analitos. SAL y MON fueron detectados en el 58% de las muestras, mientras que LAS se detectó en el 50% de las mismas. Se observaron correlaciones significativas entre SAL y los otros dos ionóforos, mientras que no se identificaron relaciones con otros parámetros como pH, conductividad y nitratos. Con límites de detección y cuantificación de 1 y 2 ng/L respectivamente. En los casos positivos, se observó un rango de concentraciones variables entre 2,3 ng/L (LAS) y 110,3 ng/L (SAL), mientras que la sumatoria promedio de ionóforos en los casos cuantificables fue de 104.1 \pm 66.3 ng/L (Tabla 21). Analizando tanto la frecuencia de detección como la carga másica total de ionóforos, se observan distintos comportamientos en cada pozo a lo largo del tiempo. Todos los freatímetros presentaron detección de más de un ionóforo en simultáneo con el *feedlot* en actividad. Dos años después al cierre (2018) en las campañas de muestreo se dieron los valores máximos de SAL y MON. La detección de los mismos podría estar asociada a la continuidad de la práctica avícola en la zona, o a la persistencia de los compuestos en el suelo (Sassman y Lee, 2007). Por otra parte, la presencia de LAS podría estar vinculado preferentemente a la práctica bovina, ya que su concentración disminuyó significativamente

luego del cierre del establecimiento. La falta de actividad productiva en la superficie, no se refleja en un cambio en el agua subterránea con lo cual se puede estar frente a un sistema que presenta degradaciones bióticas y abióticas menores, o que aún se encuentra recibiendo aportes de materiales desde la superficie.

Tabla 21. Concentraciones obtenidas en Aguas.

Campaña	AQ - ng/L	LAS	MON	SAL
2016	1	5,4	38,9	36,4
	2	57,5	30,2	60,5
	3	20,6	<LD	32,0
	4	18,5	34,9	81,5
2017	1	<LD	18,2	DNC
	2	10,3	33,1	39,7
	3	<LD	<LD	<LD
	4	<LD	0,5	0,5
2018	1	<LD	<LD	<LD
	2	<LD	25,1	25,0
	3	4,2	98,7	89,1
	4	<LD	<LD	<LD

En función de los resultados los ionóforo pueden alcanzar la napa freática a 4 m. Las concentraciones sobre el sistema estudiado fueron del orden de las caracterizadas para cuerpos de agua superficial de Argentina (Capítulo 5, Sección 5.3.3.2). En este sentido su presencia, considerando los aportes directos de la escorrentía superficial sobre ellos es esperable, es preocupante la detección de estos contaminantes emergentes a nivel freático siendo que se encuentran separados de la superficie por una columna de suelo de varios metros y si bien en la simulación de lluvias se había visto la posibilidad de detección a 20 cm de profundidad implica que el proceso de retención del suelo no es completo y los acuíferos subterráneos resultan vulnerables (Watanabe et al., 2008).

Este estudio demuestra la importancia de incorporar este tipo de compuestos en los sistemas de vigilancia de calidad de agua proveniente de napas subterráneas, demostrando el alcance

que posee la movilidad vertical en suelos de estos compuestos. Además, la presencia de ionóforos en la zona lindante al canal receptor de este sistema (Sección 5.3.3.1) representa una fuente hacia cuerpos de agua superiores como el A° Saladillo, tal como se discutirá en el capítulo siguiente para aguas superficiales.

Bibliografía

- Aga, D.S., Goldfish, R., Kulshrestha, P., 2003. Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. *The Analyst*, 128, 658–662.
- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Capparelli, A.L., Marino, D.J.G., 2019. Behavior of ionophore antibiotics in aquatic environments in Argentina: The distribution on different scales in water courses and the role of wetlands in depuration. *Environ. Int.* 133, 105144.
- Almada, N., Araujo, S., Arias, N., Bernigaud, I., Bueno, D.J., et al, 2016. *Cama de pollo en Entre Ríos: aportes para un mejor uso y manejo* (1a edición).
- APHA, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Edition, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation, Washington DC.
- Baguer, A.J., Jensen, J., Krogh, P.H., 2000. Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere*, 40, 751–757.
- Bartelt-Hunt, S., Snow, D.D., Damon-Powell, T., Miesbach, D., 2011. Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. *J. Contam. Hydrol.* 123, 94-103.
- Bernhart, M., Fasina, O.O., Fulton, J., Wood, C.W., 2010. Compaction of poultry litter. *Bioresource Technology*, 101, 234–238.
- Biswas, S., McGrath, J.M., Sapkota, A., 2012. Quantification of ionophores in aged poultry litter using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 47, 959–966.
- Bogaard, A., Fraser, R., Heaton, T.H.E., Wallace, M., Vaiglova, P., Charles, M., et al., 2013. Crop manuring and intensive land management by Europe's first farmers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 12589–12594.

- Bohn, P., Bak, S.A., Björklund, E., Krogh, K.A., Hansen, M., 2013. Abiotic degradation of antibiotic ionophores. *Environ. Pollut.* 182, 177-183.
- Boxall, A.B.A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P., Tolls, J., 2002. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicology Letters*, 131, 19–28.
- Broekaert, N., Daeseleire, E., Delezie, E., Vandecasteele, B., De Beer, T., Van Poucke, C., 2012. Can the use of coccidiostats in poultry breeding lead to residues in vegetables? An experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12411–12418.
- Carlson, J.C., y Mabury, S.A., 2006. Dissipation kinetics and mobility of chlortetracycline, tylosin, and monensin in an agricultural soil in Northumberland County, Ontario, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1–10.
- Chan, K.Y., Van Zwieten, L., Meszaros, I., Downie, A., Joseph, S., 2008. Using poultry litter biochars as soil amendments. *Australian Journal of Soil Research*, 46, 437–444.
- Davis, J.G., Truman, C.C., Kim, S.C., Ascough, J.C., Carlson, K., 2006. Antibiotic Transport via Runoff and Soil Loss. *Journal of Environmental Quality*, 35, 2250–2260.
- Dolliver, H., Gupta, S., 2008. Antibiotic Losses in Leaching and Surface Runoff from Manure-Amended Agricultural Land. *J. Environ. Qual.* 37, 1227-1237.
- Dolliver, H., Kumar, K., Gupta, S., 2007. Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil. *Journal of Environment Quality*, 36, 1224.
- Doydora, S.A., Franklin, D., Sun, P., Cabrera, M., Thompson, A., Love-Myers, K., Rema, J., Calvert, V., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., 2015. Alum and rainfall effects on ionophores in runoff from surface-applied broiler litter. *J. Environ. Qual.* 44, 1657-1666.
- Edwards, D.R., y Daniel, T.C., 1993. Effects of Poultry Litter Application Rate and Rainfall Intensity on Quality of Runoff from Fescuegrass Plots. *Journal of Environmental Quality*, 22, 361–365.

- Feng, J.C. y Thompson, D.G., 1990. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 2. Persistence in foliage and soils. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1118-1125.
- Furtula, V., Huang, L., Chambers, P.A., 2009. Determination of veterinary pharmaceuticals in poultry litter and soil by methanol extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 44, 717-723.
- Goel S., 2015. Antibiotics in the Environment: A Review. *Emerging Micro-Pollutants in the Environment: Occurrence, Fate, and Distribution*. ACS Symposium, 1198.
- Grote, M., Schwake-Anduschus, C., Michel, R., Stevens, H., Heyser, W., Langenkämper, G., et al, 2007. Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. *Landbauforschung Völkenrode*, 57, 25–32.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Tjørnelund, J., 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42, 263–271.
- Hao, C., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P., Solomon, K., 2005. Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 505-513.
- Harmel, R.D., Smith, D.R., Haney, R.L. , Dozier M., 2009. Nitrogen and phosphorus runoff from cropland and pasture fields fertilized with poultry litter. *Journal of Soil and Water Conservation* 64, 400-412.
- Heiri, O., Lotter, A. F., Lemcke, G., 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. *Journal of Paleolimnology*, 25, 101–110.
- Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A., 2005. Transport of veterinary antibiotics in overland

- flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere*, 59, 951–959.
- Kelleher B.P., Leahy J.J., Henihan A.M., O'Dwyer T.F., Sutton D., Leahy M.J., 2002. Advances in poultry litter disposal technology – a review. *Bioresource Technology* 83, 27–36.
- Kim, K.R., Owens, G., Kwon, S.I., So, K.H., Lee, D.B., Ok, Y.S., 2011. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 214, 163–174.
- Kim, S.C., Carlson, K., 2006. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed. *Water Res.* 40, 2549-2560.
- Kim, S.C., Davis, J.G., Truman, C.C., Ascough, J.C., Carlson, K., 2010a. Simulated rainfall study for transport of veterinary antibiotics - mass balance analysis. *J. Hazard. Mater.* 175, 836-843.
- Kim, S.C., Yang, J.E., Ok, Y.S., Carlson, K., 2010b. Dissolved and colloidal fraction transport of antibiotics in soil under biotic and abiotic conditions. *Water Qual. Res. J. Canada* 45, 275-285.
- Kumar, K., Gupta, S. C., Baidoo, S.K., Chander, Y., Rosen, C.J., 2005. Antibiotic Uptake by Plants from Soil Fertilized with Animal Manure. *Journal of Environment Quality*, 34, 2082.
- Lissemore, L., Hao, C., Yang, P., Sibley, P.K., Mabury, S., Solomon, K.R., 2006. An exposure assessment for selected pharmaceuticals within a watershed in Southern Ontario. *Chemosphere* 64, 717-729.
- Łukaszewicz P., Maszkowska J., Mulkiewicz E., Kumirska J., Stepnowski P., y Caban M., 2016. Impact of Veterinary Pharmaceuticals on the Agricultural Environment: A Re-inspection. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y.C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., Topp, E., 2013. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of

- detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5701–5709.
- MINAGRI, 2015. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación. Buenas prácticas de manejo y utilización de cama de pollo y guano.
- Montforts, M.H., Kalf, D.F., van Vlaardingen, P.L., Linders, J.B., 1999. The exposure assessment for veterinary medicinal products. *The Science of the Total Environment*, 225, 119–133.
- Mora, F., y Arriagada, O., 2016. A classification proposal for coefficients of variation in *Eucalyptus* experiments involving survival, growth and wood quality variables. *Bragantia*, 75, 263-267.
- Pan, M., y Chu, L. M., 2017. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Science of the Total Environment*, 599–600, 500–512.
- Pereira Ferreira, J., Romais Schmildt, E., Schmildt, O., 2016. Comparison of methods for classification of the coefficient of variation in papaya. *Revista Ceres*, 63.
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2014. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, 72, 3–27.
- Ramaswamy, J., Prasher, S.O., Patel, R.M., 2012. Sorption and desorption of salinomycin sodium in clay, loamy sand, and sandy soils. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 5363–5369.
- Ritz, C.W., Fairchild, B.D., Lacy M.P., 2009. Litter quality and broiler performance. Cooperative Extension Service, (August), 1–4.
- Rotondo, R., Firpo, I.T., Ferreras, L., Toresani, S., Gómez, S.F.E., Agrarias, F.D.C., et al, 2009. Efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas y fertilizante nitrogenado sobre

propiedades edáficas y productividad en cultivos hortícolas, 28, 18–25.

Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65, 725–759.

Sasal, M.C., Demonte, L., Cislighi, A., Gabioud, E.A., Oszust, J.D., Wilson, M.G., et al, 2015. Glyphosate loss by runoff and its relationship with phosphorus fertilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4444–4448.

Sassman, S.A., Lee, L.S., 2007. Sorption and degradation in soils of veterinary ionophore antibiotics: Monensin and Lasalocid. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1614-1621.

Schlüsener, M.P., y Bester, K., 2006. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution*, 143, 565–571.

Sun, P., Cabrera, M.L., Huang, C.H., Pavlostathis, S.G., 2014. Biodegradation of veterinary ionophore antibiotics in broiler litter and soil microcosms. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2724-2731.

Sun, P., Yao, H., Minakata, D., Crittenden, J.C., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., 2013. Acid-catalyzed transformation of ionophore veterinary antibiotics: Reaction mechanism and product implications. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6781-6789.

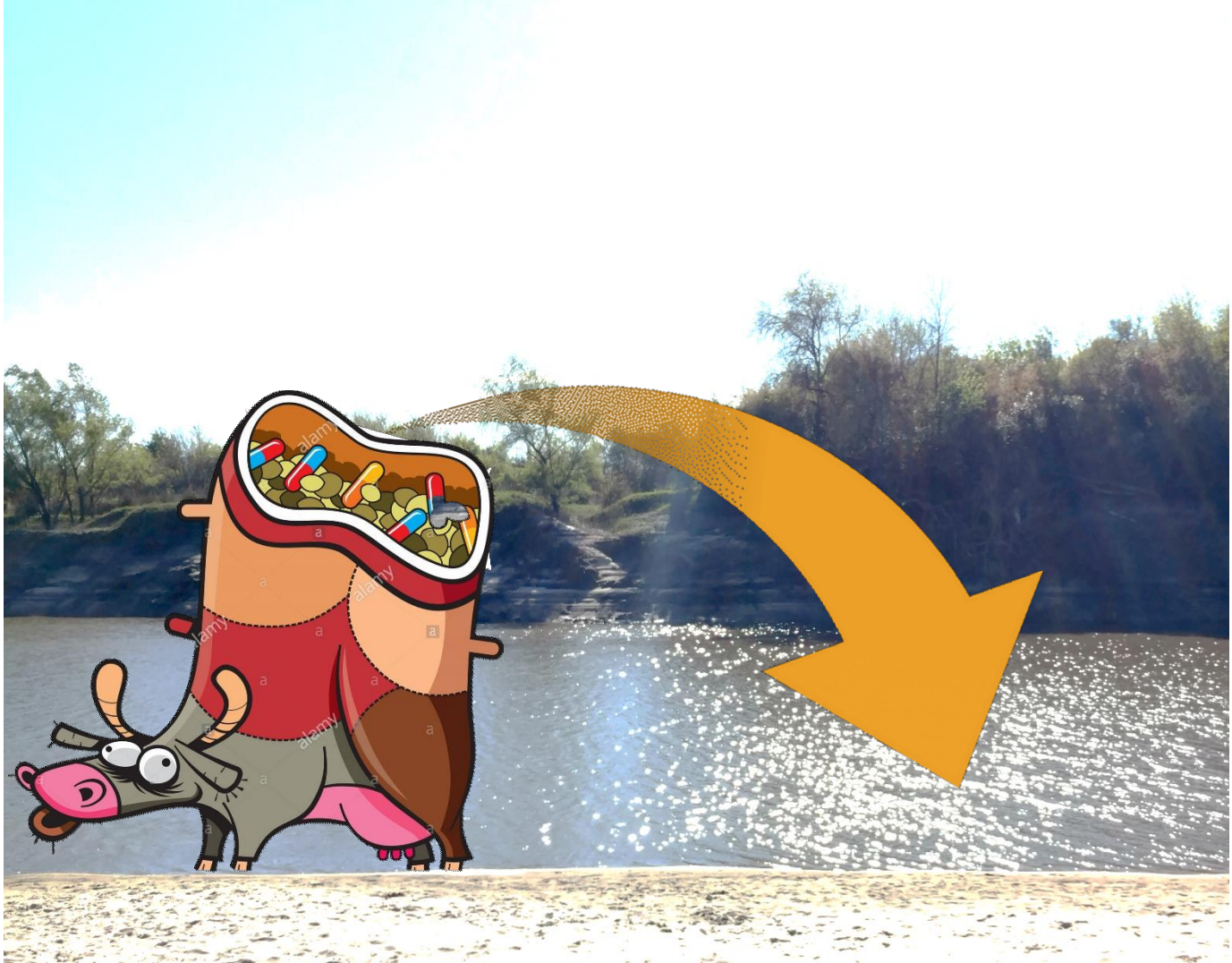
Tasho, R.P., y Cho, J.Y., 2016. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Science of the Total Environment*, 563–564, 366–376.

Taylor P.J., 2005. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.*, 38, 328–334.

Tolls, J., 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environmental Science and Technology*, 35, 3397–3406.

- Vaclavik, E., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., 2004. Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil. *Chemosphere*, 56, 667–676.
- Watanabe, N., Harter, T.H., Bergamaschi, B.A., 2008. Environmental occurrence and shallow ground water detection of the antibiotic monensin from dairy farms. *J Env. Qual* 37, S78-85.
- Winckler, C. y Grafe, A., 2001. Use of veterinary drugs in intensive animal production: Evidence for persistence of tetracycline in pig slurry. *Journal of Soils and Sediments*, 1, 66–70.
- Zarragoicoechea, P., 2019. Efectos del engorde a corral sobre la concentración de nitratos en el agua freática en el partido de Saladillo. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, Argentina.
- Zhang, Z.L., y Zhou, J.L, 2007. Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1154, 205–213.

Capítulo 5 – Dinámica ambiental de antibióticos en la región pampeana



5. Dinámica ambiental de antibióticos en la región pampeana

5.1. Introducción

Como se presentó en el capítulo previo, existen múltiples fuentes de ingreso de antibióticos a los ecosistemas acuáticos, relacionadas principalmente con las estrategias de uso y disposición de las excretas animales.

Se puede observar que los valores de concentración reportados son muy variables cuando se comparan dentro de una misma matriz, ya sea entre los diferentes países o autores. Esto pone en evidencia la complejidad del estudio ambiental para esta familia de moléculas, es decir, la concentración en el ambiente está condicionada múltiples factores, como las dosis empleadas en cada granja, si se realiza o no compostaje, tiempo de estabilización, etc.

Se tendrán en cuenta parámetros característicos de cada esfera ambiental estudiada, ya sea por mediciones propias o por articulación con los proyectos marco del presente trabajo. Las mismas incluyen variables de calidad de aguas (pH, conductividad, sólidos en suspensión y materia orgánica disuelta), de suelos y sedimentos (contenido de materia orgánica), y de dinámica atmosférica (temperaturas máximas y mínimas, frecuencia de lluvias, volumen de precipitaciones, vientos). Las concentraciones detectadas en estos compartimentos ambientales serán agrupadas en conjuntos de datos por región de estudio, para explorar por medio de metodologías de análisis estadístico multivariado (Análisis de Componentes Principales y Análisis de Discriminantes y correlación canónica), la inter-dependencia de características métricas del medio físico con la variedad y concentración de fármacos en cada uno de ellos (Busso y Santa Cruz, 2005). Adicionalmente, modelos matemáticos y

correlaciones serán evaluados para caracterizar la dependencia de las variables estudiadas en la remoción versus la concentración de los distintos fármacos.

5.2. Metodología

5.2.1. Área de estudio – región pampeana

Los sitios de monitoreo seleccionados se ubican en la provincia de Buenos Aires y Entre Ríos, sobre los que se realizó un seguimiento temporal y se suman casos particulares de estudio como la cuenca alta del río Paraná-Paraguay y Uruguay en articulación con Prefectura Naval Argentina que facilitó el acceso a estos escenarios.

En Buenos Aires (BA) se seleccionaron zonas pertenecientes a la cuenca del Salado debido a que sobre ella se produce el 25% del total de cabezas ganaderas del país (Arzubi et al., 2015). Además, esta cuenca es un sistema de tipo abierto, donde sus subsistemas están interrelacionados y cualquier cambio en las condiciones de transporte y acumulación de un sitio, traerá cambios en otras zonas (Herzer et al., 2004). Adicionalmente se presentan ciclos de inundaciones prolongadas lo que constituye una región con alta movilidad de contaminantes y sitios con pajonales que pueden actuar como sistemas naturales de depuración (Secretaría de de Insfractuctura y Política Hídrica de la Nación, 2018).

En Entre Ríos, alrededor del 76% de las granjas productoras avícolas se ubican sobre los departamentos Uruguay, Colón, Paraná y Gualeguaychú (Schell et al., 2010). Se seleccionaron zonas contenidas en estas regiones con especial énfasis al estudio de sitios ubicados en el Delta del Paraná entrerriano ya que la oferta de bienes y servicios se subordinan (al igual que

la cuenca del Salado) a pulsos de inundación-seca (Kandus et al., 2010). En particular, esta zona entrerriana se trabaja articuladamente en el marco del proyecto PICT2014-0919 “Flujo de nutrientes, distribución de contaminantes, impactos ambientales de actividades productivas y alternativas de mitigación en el sistema de humedales del Delta del Paraná (Delta Entrerriano)” siendo los sitios allí contenidos los de mayor seguimiento espacial y temporal.

5.2.2. Sitios y campañas estudiadas

Los sitios de monitoreo (Tabla 22 y Figura 35) se dividieron en 3 categorías considerando la influencia de la producción animal sobre ellos: colectores primarios (CP); receptores secundarios (RS); humedales (HU). Para las muestras de CP se monitorearon colectores de agua de bajo flujo adyacentes a instalaciones de producción (ganado y aves de corral) de secciones representativas de la región pampeana, ya que son receptores directos de heces y escurrimiento superficial de corrales, constituyéndose como un receptor primario de la contaminación que puede actuar como “goteo” hacia otros cuerpos de agua.

Tabla 22. Descripción de la región de estudio y las secciones monitoreadas.

Provincia	Entre Ríos			Buenos Aires	-	-	Entre Ríos
Animales							
Bovinos	4.187.378			18.615.034			
Aves	364.437.857			259.677.204			
Area	(PAR)	(GUA)	(URU)	Saladillo (BA)	Alto Paraná (AP)	Colectores Primarios (CP)	Humedal Delta del Paraná (HU)
Producción Prevalente	Aves (Ponedoras)	Mixta	Aves (Parrilleros)	Bovino/ Porcino	Mixta	Mixta	Bovino
Período de muestreo	Junio 2015 - Marzo 2018						

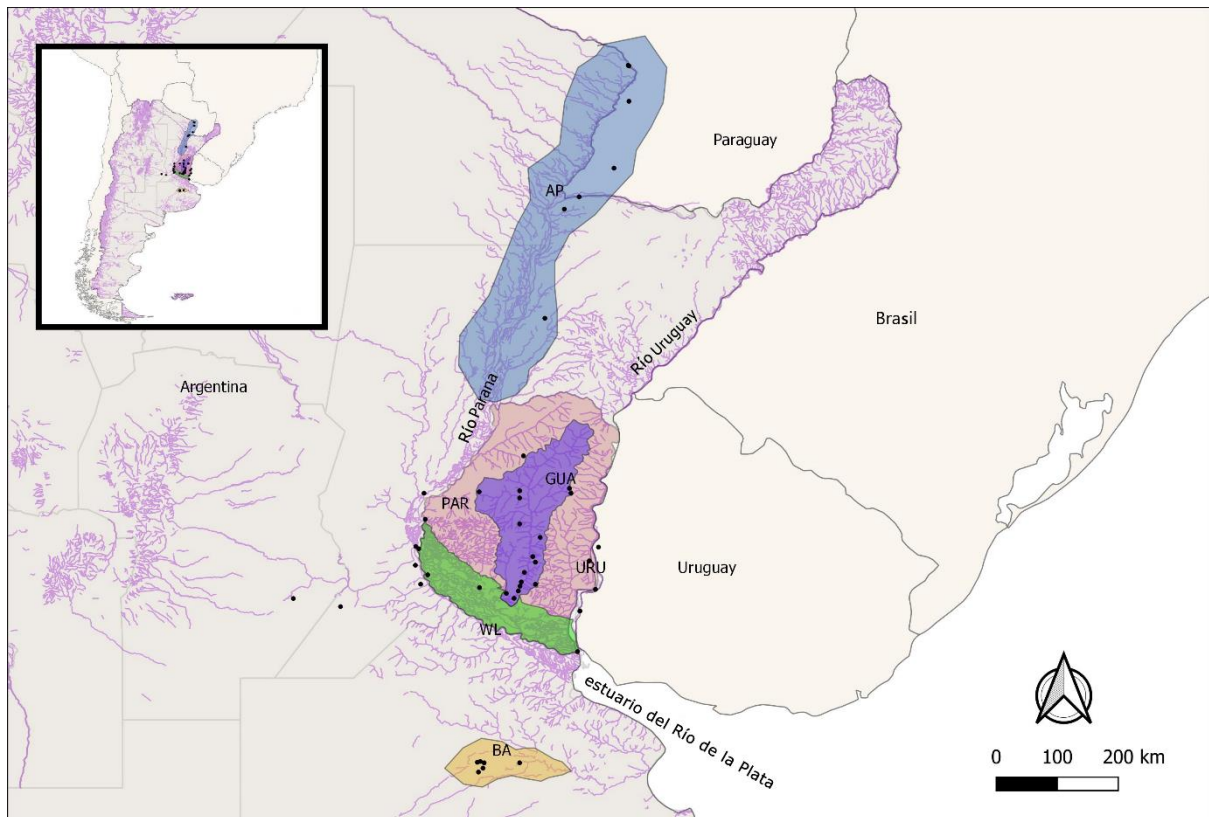


Figura 35. Sitios de muestreo. Elaboración Propia.

En contraste, se monitorearon 5 zonas dentro del Delta del Río Paraná (HU) como parte del sistema hídrico de la región entrerriana para evaluar el comportamiento de los antibióticos ionóforos sobre este sistema. A pesar de que la introducción de ganado en las últimas décadas sobre la región del humedal se trabajó bajo prácticas de alimentación por pastoreo, se han mostrado consecuencias ambientales posteriores como variaciones en las concentraciones de nutrientes (N, P) en sectores del humedal (Mesa et al., 2015). De todas maneras, las prácticas de manejo involucran el pastoreo sin el uso de promotores de crecimiento, por lo tanto, no se esperan insumos in situ de antibióticos ionóforos.

En cuanto a la categoría de "Receptores Secundarios" (RS), se tomaron muestras de agua superficial en el curso mayor de los ríos principales, o en la confluencia de sus principales afluentes de acuerdo con la accesibilidad, para evaluar el aporte de los ionóforos desde estos

cuerpos de agua al curso principal. La categoría de RS incluye 5 sub-cuencas: Gualedguay (GUA), Uruguay (URU), “Alto” Paraná (AP), “Bajo” Paraná (PAR) y Saladillo (BA). El área estudiada constituye el epicentro agroproductivo de Argentina, concentrando más del 70% de la producción agrícola y ganadera. En términos de producción animal, existen núcleos productivos dispersos a lo largo del país, sin embargo, es la región pampeana donde se concentran las mayores densidades de instalaciones de ganado y aves de corral. Las mismas se distribuyen principalmente entre las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos. Las secciones fueron seleccionadas de acuerdo a su actividad predominante: producción avícola, bovina o mixta. En esta última categoría se incluyó la producción porcina dado que algunos de los sitios escogidos como colectores primarios, se veían inevitablemente afectados por efluentes provenientes de establecimientos de este tipo.

Según Castillo et al., (2016) de acuerdo con la densidad animal y el tipo de avicultura realizada, la sección URU (región oriental de la provincia) se caracteriza por la producción de carne – pollos de engorde – mientras que la producción de huevos predomina en el oeste, en la sección denominada PAR cuyo límite oeste es el río Paraná (Castillo et al., 2016). La sub-cuenca de Gualedguay (GUA) es de uso mixto que incluye la producción de aves de corral y ganado (Tabla 22). En términos de la relevancia productiva de GUA y su influencia directa sobre el delta del río Paraná, ambos sistemas hidrológicos se estudiaron en detalle en 4 períodos de muestreo estacionales.

El área estudiada comprendió cuerpos de agua representativos de las regiones mesopotámica y pampeana, ubicadas en la cuenca del Plata, la segunda más grande de América del Sur. Para la región mesopotámica, la sección norte del río Paraná (AP) se tomó como una sección

integral que incluía afluentes cerca del límite del país de Paraguay a la provincia de Corrientes (Argentina).

5.2.3. Muestreo

5.2.3.1. Agua y Sólidos en Suspensión (SS)

Las muestras de agua superficial se recogieron en los primeros 50 cm de la columna de agua y se filtraron *in situ* a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de 0,45 µm para discriminar entre fracción soluble y particulada (APHA, 1998). Se colectaron 500 mL de agua, obteniendo dos muestras de 100 ml de agua filtrada por sitio en una botella de vidrio, las cuales se acondicionaron mediante la adición de metanol hasta lograr 1% y 5 ml de Na₂EDTA al 5% p/v como agentes auxiliares antibacterianos y complejante de metales respectivamente (Ben et al., 2008; Tong et al., 2009), posteriormente se mantuvieron en un refrigerador a 4°C durante el traslado al laboratorio. Las muestras se almacenaron luego a -20°C hasta el momento del procesamiento, según APHA (1998) y Kennedy et al. (1998). Una segunda muestra de agua filtrada de 50 ml se dispuso en una botella de vidrio sin aditivos para el análisis de la demanda química de oxígeno (DQO) dentro de las 24 horas posteriores al muestreo (APHA, 1998).

Para la determinación de los SS, en campo se hicieron pasar 100 mL de muestra a través de filtros de membrana de nylon (0,45 µm) pre-pesados. La filtración se llevó a cabo mediante un equipo Sartorius 250-mL de policarbonato asociado a una bomba de vacío portátil. Los filtros pre y post muestreo se secaron por al menos 24 horas en desecador, luego fueron pesados (hasta pesada constante) y por último conservados en frío hasta su análisis.



Figura 36. Toma de muestra de agua y sedimentos en sitios de monitoreo de la subcuenca del Gualaguay.

5.2.3.2. Sedimentos

Se tomaron muestras integradas de sedimentos de fondo de los sitios indicados en la Tabla 22. Se colectaron los primeros 5 cm de sedimento de fondo con una draga tipo Eckman, los cuales se conservaron en bolsas plásticas posteriormente selladas y se mantuvieron a 4°C hasta su traslado al laboratorio (Figura 37) Previo a su conservación en freezer hasta el análisis

(-20°C), se homogenizó la muestra y fraccionó una porción de 10 g para el análisis de humedad y materia orgánica.



Figura 37. Registro de muestras ingresadas al laboratorio.

5.2.4. Caracterización Fisicoquímica

5.2.4.1. Parámetros generales

Los parámetros fisicoquímicos generales de calidad de aguas para cada sitio monitoreado (conductividad eléctrica, pH, temperatura y oxígeno disuelto) fueron medidos *in situ* mediante una sonda multiparamétrica (Multiparameter water quality monitor HORIBA U-52™).

5.2.4.2. DQO

El análisis de la demanda química de oxígeno (DQO) para las muestras de agua se realizó en el laboratorio de acuerdo al método colorimétrico 5220-D (reducción de dicromato de potasio), según APHA (1998).

5.2.4.3. Fósforo Reactivo Soluble

El fósforo reactivo soluble en aguas fue cuantificado por colorimetría mediante el método 4500P-C del ácido Vanadomolibdofosfórico (APHA, 1998).

5.2.4.4. Humedad y Materia orgánica

La determinación del porcentaje de humedad de los sedimentos se obtuvo por diferencia de pesada entre la masa a temperatura ambiente y la masa constante a 105°C. Se pesaron 5 g de sedimento en cápsulas de porcelana pre-acondicionadas a 550°C, pesadas previamente. El contenido de materia orgánica se determinó por calcinación (*Loss of ignition* – LOI) a 550°C (APHA, 1998; Heiri et al., 2001).

5.2.5. Análisis de antibióticos

En la Sección 3.12 se pueden observar los métodos aplicados para la extracción de los fármacos veterinarios estudiados en aguas (fracción soluble), SS y sedimentos. En la Tabla 14 se presentan los límites de detección y cuantificación metodológicos (LDM y LCM)

correspondientes en cada caso. Las metodologías en detalle para estos contaminantes fueron presentadas y discutidas en capítulos anteriores (Capítulo 3 y Capítulo 4).

5.2.6. Análisis de información

Dadas las características de los conjuntos de datos ambientales para contaminantes emergentes a nivel de traza, señalados por las bajas frecuencias de detección (Antweiler, 2008), se evaluaron y analizaron diferentes herramientas para la gestión de datos y la determinación de parámetros estadísticos del conjunto de datos (Alonso et al., 2019). Se exploraron seis enfoques para los cálculos estadísticos descriptivos: eliminación de valores \leq límite de detección (LDM), técnicas de sustitución que reemplazan valores \leq LDM con $\frac{1}{2}$ LDM y $(\sqrt{2}/2)$ LDM, y 3 métodos de imputación: Kaplan-Meier (KM), regresión de orden estadístico (ROE) y estimación máxima de similitud (EMS).

A partir del análisis de Shapiro-Wilks, se detectó la falta de ajuste normal de la distribución de los datos. Así, la comparación entre los sitios de muestreo se realizó mediante tablas de contingencia, pruebas de Kruskal-Wallis y Friedman según Helsel (2012) para datos censurados con un solo LOD. Para el manejo de los datos en los análisis comparativos entre grupos, se adoptó una estrategia de sustitución de valores \leq LOD por el valor de \leq LOD/2. Si bien se ha reportado que para porcentajes de censura mayores al 40%, las técnicas pierden eficacia en la estimación de la probabilidad real, el uso de técnicas de sustitución de datos \leq LOD es una de las estrategias más prácticas reportadas para el manejo de datos ambientales con estas características (Consejo de Comunidades Europeas, 2009; Clarke, 1998). Se aplicaron pruebas de correlación de Spearman para evaluar las asociaciones entre los

parámetros de calidad del agua y las concentraciones de antibióticos en la columna de agua y sedimentos. Todas las pruebas se consideraron estadísticamente significativas para valores de $p \leq 0.05$. Los análisis se realizaron con el software R (R Core Team, 2018) y las funciones del paquete NADA (Lee, 2017), y con el software INFOSTAT®.

Tabla 23. Resumen de los datos de Ionóforos para la región comparando los tres modelos de imputación de datos con los modelos de sustitución.

		n	Media	Mediana	SD	Datos faltantes	%Censurado
Valores < LDM	LAS	16	78,75	12,65	140,18	53	69
	MON	30	308,79	91,58	870,41	39	56
	SAL	19	96,77	25,6	295,60	50	72
Sustitución LDM/2	LAS	69	18,92	0,85	73,7	0	0
	MON	69	134,74	0,85	588,85	0	0
	SAL	69	27,26	0,85	140,37	0	0
Sustitución v(LeDM/2)	LAS	69	19,17	1,20	73,63	0	0
	MON	69	134,93	1,20	588,81	0	0
	SAL	69	27,51	1,20	140,32	0	0
Kaplan-Meier (KM)	LAS	69	20,22	-	75,23	53	76
	MON	69	135,69	-	594,34	39	56
	SAL	69	28,49	-	142,9	50	72
Regresión de orden estadístico (ROE)	LAS	69	18,40	0,09	73,82	53	76
	MON	69	135,31	4,09	588,7	39	56
	SAL	69	26,87	0,23	140,44	50	72
Estimación de máxima similitud (EMS)	LAS	69	3207,6	0,03	3,6e+8	53	76
	MON	69	83285,1	0,6	1,1e+10	39	56
	SAL	69	2755,83	0,06	1,2e+8	50	72

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Descripción estadística de los datos regionales

Los datos detallados se muestran en el Anexo I y se presenta el resumen de los datos de ionóforos para la región en la Tabla 23 comparando los tres modelos de imputación de datos con los modelos de sustitución. Dado que la tabla del Anexo I se construyó con anterioridad a la finalización de los muestreos, la clasificación de los sitios BA y CP posee pequeñas

modificaciones respecto a la clasificación final, y por eso se presenta únicamente a modo ilustrativo para ambas categorías, siendo los valores discutidos en el texto los valores finalmente analizados. Se observó que los estadísticos de tendencia central como la media y mediana se desvían en órdenes de magnitud (hasta 2 en algunos casos) entre los diferentes métodos de estimación probados. Para informar a los estadísticos descriptivos, se siguieron las pautas propuestas por Helsel (2012 - Capítulo 6), según el número de observaciones disponibles (n) y el porcentaje de datos censurados (entiéndase por censurado a resultados no detectables). El resultado de la estimación KM se informó para un $\leq 50\%$ de censura (considerado como el porcentaje de datos $\leq \text{LOD}$), mientras que el resultado de EOR se presentó para censurar entre el 50-80%. Para $> 80\%$, solo se informan proporciones censuradas y LOD (tablas 4 y 5). Los resultados obtenidos para cada categoría se discuten en secciones sucesivas. Aunque la bibliografía está incorporando los enfoques de imputación robustos (Helsel, 2012; Antwiller 2008), dada la discrepancia, se debe considerar que genera pautas claras para informar las concentraciones ambientales de este tipo de contaminantes, ya que estos valores se utilizan para la estimación de riesgos que podrían subestimarse cuando se aplican métodos de eliminación o sustitución de datos de manera arbitraria (Antweiller 2008). La estrategia debe considerar no eliminar la información de las observaciones y evitar valores de sustitución arbitrarios, con énfasis en la asignación del método más robusto en función del número de observaciones y el porcentaje de censura (Helsel, 2012).

5.3.2. Calidad de agua de la región pampeana – parámetros fisicoquímicos generales

Los parámetros generales de las muestras se pueden observar en la Tabla 24. Los parámetros presentaron rangos esperables para cursos de agua naturales de la región (Ronco et al., 2016). Los valores de temperatura registrados en los muestreos de GUA y HU fueron consistentes con la estacionalidad, con mínimos de 13,2 y 10,7°C en invierno, y 28,9°C en verano. El rango de pH encontrado fue de 6,4 a 8,8 UpH, con valores un poco superiores a otros registros de cuencas pampeanas – entre 6,5 – 8,0 UpH en la cuenca del río Paraná (Ronco et al., 2016).

Tabla 24. Parámetros fisicoquímicos generales para los cuerpos de agua superficial estudiados.

Área		T (°C)	pH	Cond (µS/cm)	DO (mg/L)	DQO (mg/L)	SS (mg/L)
AP	Media ±SD	21,0 ±0,6	7,7 ±0,4	521 ±437	5,8 ±1,9	129 ±29	224 ±161
	Min	20,3	7,0	78,1	2,78	99	91
	Max	21,8	8,4	1237	7,7	158	539
BA	Media ±SD	18,9 ±4,6	7,7 ±0,6	1215 ±1441	-	56 ±16	224 ±77
	Min	16,1	7,1	7,9	-	32	110
	Max	26,9	8,5	3720	7,8	77	320
GUA	Media ±SD	19,2 ±5,4	7,4 ±0,5	407 ±548	6,3 ±1,0	63 ±47	111 ±48
	Min	13,2	6,4	101	4,2	1,8	16
	Max	28,9	8,8	3010	8,4	148	211
PAR	Media ±SD	18,5 ±0,9	8,0 ±0,3	1782 ±2756	8,2 ±0,6	44 ±20	118 ±90
	Min	17,2	7,7	133,5	7,1	26	25
	Max	19,6	8,4	7600	8,8	65	294
URU	Media ±SD	19,8 ±3,2	7,4 ±0,2	182 ±125	5,9 ±1,4	36 ±13	272 ±348
	Min	16,8	7,0	30	4,0	17	28
	Max	27,2	7,7	378	8,5	57,2	1052
HU	Media ±SD	18,8 ±6,0	7,6 ±0,4	370 ±256	8,2 ±1,6	29 ±22	-
	Min	10,7	7,0	74,4	3,9	3,7	-
	Max	28,9	8,2	970	10,3	85,5	-
CP	Media ±SD	16,5 ±5,2	7,7 ±0,6	2346 ±3452	6,2 ±2,8	623 ±650	1219 ±974
	Min	12,4	7,0	93	4,1	64,3	189
	Max	26,8	8,6	9270	8,6	1630	3221

Cond, conductividad eléctrica; OD, concentración de oxígeno disuelto; DQO, demanda química de oxígeno.

AP, Alto Paraná; BA, Saladillo; GUA, Gualaguay; PAR, Paraná; URU, Uruguay; HU, Humedal (Delta del Paraná); CP, colector principal.

En relación a los parámetros fisicoquímicos, los colectores primarios (categoría “CP”) monitoreados presentaron mayores niveles significativos de DQO y SS que los cuerpos de agua no influenciados directamente por sitios de cría (categoría “RS”) ($\alpha=0,05$). Los CP

además presentaron los valores máximos de conductividad. La menor dimensión de los sistemas, sumado a los aportes de excretas mediante escorrentía o desbordes de lagunas de tratamiento, pueden ser causantes de las elevadas cantidades de sólidos y cargas orgánicas.

5.3.3. Ingreso y transporte de antibióticos veterinarios en ambientes acuáticos.

5.3.3.1. Cuerpos de agua directamente influenciados por establecimientos de cría (CP)

Las excretas animales constituyen la principal fuente de fármacos veterinarios al ambiente tanto de forma indirecta a través de su utilización como enmienda (tal como se trató en el capítulo 4), así como directa, a partir de la movilización del material hacia cuerpos receptores desde los establecimientos productivos. La presencia de niveles de ionóforos y tetraciclinas reportados a nivel mundial en excretas provenientes de instalaciones animales van desde los 0,01 a 10 mg/kg (Arikan et al., 2009; Biswas et al., 2012; Furtula et al., 2009). Según el tipo de instalación y el desarrollo invertido en el tratamiento de sus desechos, las excretas pueden ser tratadas en lagunas de aireación, o ser arrastradas por escorrentía hacia canales, arroyos o hasta ríos lindantes, confiriendo así cargas de fármacos de hasta 250 µg/L de tetraciclinas (Awad et al., 2014; Ben et al., 2008) o 84,3 µg/L de ionóforos como monensina (Sandoz et al., 2018).

En este trabajo, los canales o arroyos seleccionados como “Colectores primarios – CP”, se seleccionaron de acuerdo a algunos requisitos mínimos como la cercanía a establecimientos animales, la posibilidad de ser receptores de escorrentía desde dichos establecimientos, y la

accesibilidad para la toma de muestra. En el relevamiento descriptivo de ellos, de los 5 sitios seleccionados, 3 están influenciados por la presencia de un establecimiento único (2 bovinos y 1 porcino), mientras que los 2 restantes reciben descargas de producciones mixtas (bovina-porcina y bovina-avícola). El sitio de influencia porcina y el sitio bovino-avícola fueron monitoreados 2 y 3 veces en el tiempo respectivamente (2016-2017, y 2015-2017). En todos los casos se constató la presencia de fuertes olores en las cercanías del colector. En los sitios de Saladillo (Figura 38), se observó además un alto contenido de vegetación vinculada a los cuerpos de agua, además de otros cuerpos eutrofizados en las cercanías (son cursos de agua poco profundos y de bajo caudal).



Figura 38. Sitios de monitoreo correspondientes a la categoría CP. Las imágenes a la izquierda corresponden al sitio "Colector 1". La imagen a la derecha corresponde al sitio "Colector 4".

El compuesto más detectado en aguas, SS y sedimentos de fondo fue MON (75, 25 y 25% respectivamente), seguido por otro ionóforo (SAL en agua y sedimento – 50 y 13%), mientras que, para las tetraciclinas, la OTC fue la más frecuentemente observada en las tres matrices (37, 13 y 13% respectivamente). Los 3 compuestos mencionados presentaron co-ocurrencia

en 3 de los 8 sitios, acompañados por LAS en dos de los casos y por TTC en el otro. Si bien no se reportan estrategias de uso combinado de ambas familias, su aplicación individual en el alimento es aceptada sin contraindicaciones (Sarmah et al., 2006).

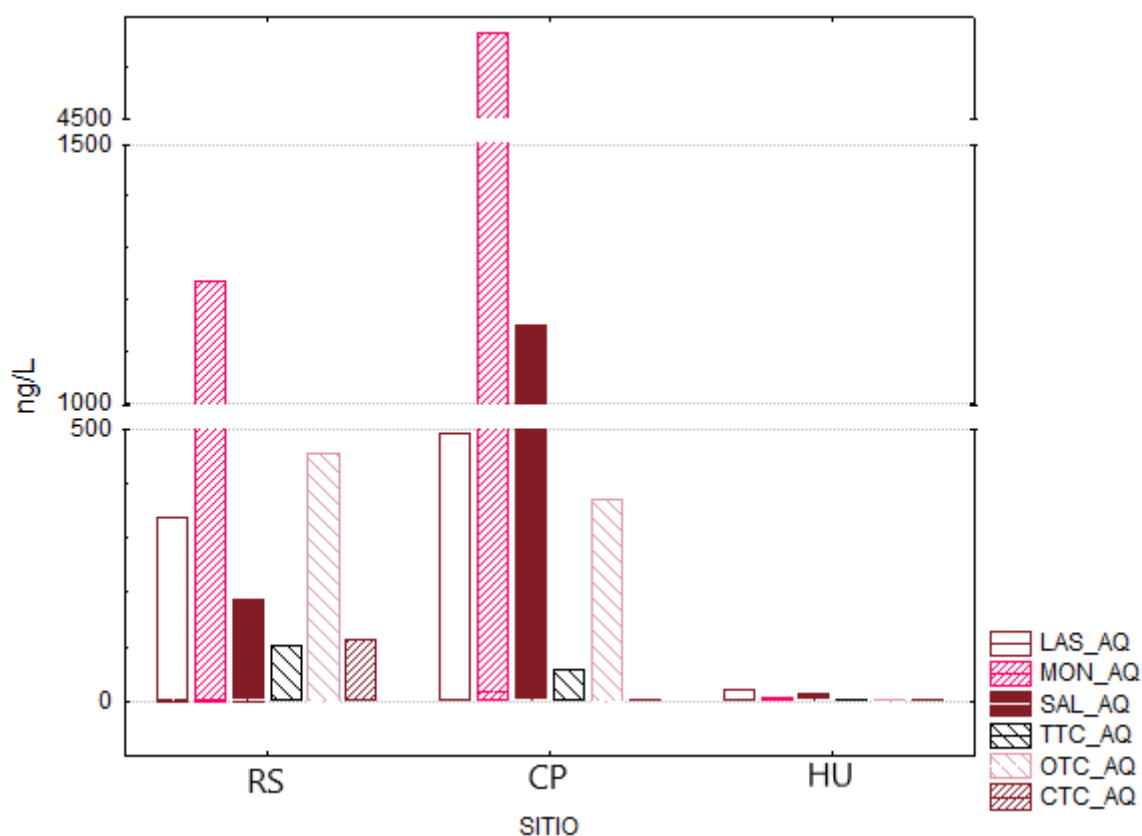


Figura 39. Concentraciones de antibióticos veterinarios en la fracción soluble de aguas superficiales de la región pampeana, clasificadas por el tipo de sitio monitoreado: ríos y arroyos no directamente influenciados por sitios de cría (RS); colectores primarios influenciados por sitios de cría (CP); sitios correspondientes al humedal del Delta del Paraná (HU).

Respecto a las aguas de los PC: MON (4670 ng/L), SAL (1150 ng/L) y LAS (490 ng/L) presentaron las concentraciones máximas del estudio (Figura 39), todos los valores dentro del rango informado por otros autores para este tipo de cuerpos de agua receptores (Song et al., 2007; Watanabe et al., 2008). Estos valores máximos ocurrieron en el mismo sitio, un canal en la provincia de Córdoba, en el cual además se observó el segundo valor más alto de OTC. A través de comunicaciones personales con vecinos de la zona, se supo que dicho canal

recibe agua de lavado de camiones transportadores de animales, recibiendo material crudo, lo cual, en caso de darse esa acción, representaría un factor importante para explicar las altas concentraciones halladas.

Los niveles de MON en las muestras de agua de los sitios CP fueron significativamente mayores que las concentraciones en los sitios RS (analizadas en la Sección 5.3.3.2), con una media \pm SD (mediana) de 940 ± 1531 ng/L (251 ng/L) más de 32 veces por encima de la media encontrada para los cuerpos de agua de la categoría RS de las muestras del presente trabajo. No se observaron diferencias para el resto de los antibióticos. La MON es considerada uno de los fármacos veterinarios más utilizado en el país (Yoshida et al., 2010) y en función de los resultados obtenidos en ambientes acuáticos, se estaría reflejando tanto en las frecuencias de detección como las concentraciones.

La frecuencia de detección de antibióticos en los SS y sedimentos de fondo fue inferior a la observada en aguas. No hubo detecciones de CTC en SS, mientras que MON, SAL y OTC fueron detectadas en todas las matrices. La mayor detección correspondió a MON (38% en SS y 25% en sedimentos de fondo), mientras que el resto de los antibióticos solo dieron 1 positivo en SS (LAS y OTC) y/o en sedimentos (SAL, OTC y CTC). Es destacable la presencia particular de CTC en el sedimento de un canal ubicado en inmediaciones de una planta de producción porcina que, además, co-ocurre junto a OTC y MON. La concentración observada de CTC fue de 4923 ng/kg siendo el único caso cuantificable del presente trabajo. Se conoce que dicho tipo de industria, para la producción de carne porcina, utiliza compuestos de la familia de las tetraciclinas, habiendo detectado en otros trabajos concentraciones sedimentos de arroyos colectores de entre 140 y 1600 ng/kg, y en excretas porcinas en concentraciones del orden de los mg/kg (Awad et al., 2014; Martínez-Carballo et al., 2007).

Se realizó una evaluación comparativa de las concentraciones de MON entre los sitios CP y RS en las matrices sólidas estudiadas (SS y sedimentos de fondo). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones detectadas de este compuesto entre SS-CP y SS-RS ni en sedimentos de fondo (sólo fue posible estudiar el caso de MON debido a la baja detección del resto de los antibióticos). A diferencia de las aguas, los sedimentos no presentan un carácter de receptores primarios. Se evalúan distintas alternativas para explicar este fenómeno: por un lado, es posible que el transporte de los fármacos ocurra ligado al material más fino, movilizándose a mayores distancias en lugar de sedimentarse en el canal o arroyo (CP) al que ingresan la velocidad de flujo del cuerpo de agua determina el movimiento preferencial respecto a la velocidad de sedimentación (Basile, 2018). Por otra parte, se conoce del rol de las comunidades microbianas adaptadas a las condiciones de estos sedimentos receptores, que logren una rápida degradación de los compuestos estudiados ya que tienen como base de su composición química solo átomos de C, H y O (Reis et al., 2015).

En función de los resultados obtenidos, se puede proponer que los sitios estudiados cumplen con los perfiles generales y específicos de cuerpos receptores de excretas animales esperados (Awad et al., 2014). Además, los mayores valores de DQO y SS se encuentran en los CP, en donde la presencia de cargas de antibióticos indica el ingreso de escurrimientos con materia fecal proveniente de sitios de producción animal próximos a estos cuerpos de agua. La incorporación del material “crudo” en los cuerpos de agua y la influencia de aguas residuales son contribuciones determinantes a las concentraciones significativamente superiores de MON observadas en los CP respecto a los sitios RS. Por otra parte, los efectos de dilución y degradación influyen en los niveles menores (comparativamente) que se encuentran en

cursos distantes de las instalaciones de los animales, o incluso otro tipo de proceso puede dominar la entrada de estos antibióticos en tales sitios.

En la Tabla 25 se presenta la frecuencia de detección de cada antibiótico, expresada como porcentaje, según la categoría del sitio de muestreo: colector primario (CP), receptores secundarios (RS) o humedal (HU).

Tabla 25. Frecuencia de detección en las distintas matrices analizadas.

Fármaco	Categoría	FD% - Agua	FD% - SS	FD% - Sedimento
LAS	CP	25	13	0
	RS	23	11	3
	HU	0	0	0
MON	CP	75	38	25
	RS	41	20	23
	HU	5	0	0
SAL	CP	50	13	13
	RS	21	15	15
	HU	0	0	0
TTC	CP	13	0	0
	RS	7	2	3
	HU	0	0	0
OTC	CP	38	13	13
	RS	15	5	2
	HU	5	0	0
CTC	CP	13	0	13
	RS	3	0	0
	HU	0	0	0

5.3.3.2. Principales cursos de aguas y afluentes de la región pampeana: receptores secundarios (RS)

Una vez caracterizados los CP, el estudio se centró en el análisis apartado de los sitios RS, caracterizados por encontrarse a distancias superiores de sitios de producción y representando escenarios donde la llegada de los antibióticos ocurra por vía indirecta (principalmente escorrentía superficial por suelos con enmiendas, transporte desde cuerpos receptores primarios – CP).

Las tetraciclinas presentaron detecciones inferiores a los ionóforos, siendo la OTC la más ocurrente con un 16% de detecciones positivas, de manera similar a lo reportado por Lindsey et al. en Estados Unidos (Lindsey et al., 2001). En relación a las concentraciones observadas, en todos los casos las medianas se encuentran por debajo del LDM correspondiente. Las tetraciclinas han sido objeto de numerosos estudios debido al riesgo que presentan promoviendo el desarrollo de genes de resistencia en las comunidades microbianas ambientales (Chee-Sanford et al., 2001; Mackie et al., 2006; Tao et al., 2010), lo cual ha motivado búsquedas de alternativas para la disminución de su uso. Por otra parte, son muy susceptibles a ser transformadas por procesos de hidrólisis y fotólisis (Boreen et al., 2003; Xuan et al., 2010), presentando múltiples derivados (Sección 3.9.3).

A raíz de la baja detección de tetraciclinas (TTC, OTC y CTC menor al 80% de detección), el análisis individual carece de sentido estadístico. A fines de poder realizar un diagnóstico exploratorio con los datos obtenidos, se propone como alternativa la definición de una nueva variable que represente la suma de las 3 moléculas (Carga másica total de la familia). Trabajando las tetraciclinas (STC) como una sumatoria, obtenemos que un 38% de las muestras presentó la presencia de al menos 1 molécula de la familia. La mediana más alta entre las subregiones fue 134 ng/L y se observó en BA, sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre los sitios RS. La tendencia observada en BA podría indicar mayor relevancia de las tetraciclinas en la actividad predominantemente de tipo bovina y porcina, sin embargo, la concentración máxima fue de 455 ng/L y fue detectada en el Arroyo Grande (URU), zona de alta densidad de producción avícola. Esta concentración se encuentra en el rango de otros máximos publicados en la literatura – 80 ng/L (Yang et al., 2004), 1340 ng/L (Lindsey et al., 2001), y 2750 ng/L (Ok et al., 2011).

Tabla 26. Concentraciones de antibióticos veterinarios analizados en la fracción soluble de las aguas superficiales monitoreadas. El conjunto de datos completo se seccionó por: categoría, zona, sitio, campaña y nivel del curso de agua estudiado.

Categoría	Zona	Sitio	Campaña	Nivel	AGUA (fracción soluble - ng/L)					
					LAS	MON	SAL	TTC	OTC	CTC
CP	CP	Canal MM S/N	1	T	490	4670	1150	<LD	370	<LD
		A° Chañar	1	T	<LD	1080	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° S/N	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° S/N	2	T	<LD	35	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° S/N	3	T	<LD	288	78	57	<LD	<LD
		Colector 1	1	T	<LD	1234	187	<LD	88	111
		Colector 2	1	T	138	214	132	<LD	213	<LD
		Colector 1	2	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
RS	GUA	Río Gualaguay Post-Ciudad	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Villa Larroque	1	P	<LD	<LD	48	<LD	<LD	<LD
		Urdinarraín	1	T	<LD	37	<LD	<LD	24	<LD
		Rosario del Tala	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gob. Mansilla	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	89	<LD
		Aldea Asunción	1	T	<LD	25	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Arrecifes	1	T	<LD	46	<LD	<LD	DNC	<LD
		Canal Feedlot	1	T	<LD	127	8	102	<LD	22
		Río Gualaguay Pre-Ciudad	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río Gualaguay Post-Ciudad	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Villa Larroque	2	T	<LD	32	38	<LD	<LD	<LD
		Urdinarraín	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rosario del Tala	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Aldea Asunción	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río Gualaguay Post-Ciudad	3	P	DNC	171	DNC	N/A	N/A	N/A
		Villa Larroque	3	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Urdinarraín	3	T	4	146	<LD	N/A	N/A	N/A
		Rosario del Tala	3	P	<LD	125	<LD	N/A	N/A	N/A
		Gob. Mansilla	3	T	<LD	177	DNC	N/A	N/A	N/A
		Aldea Asunción	3	T	<LD	128	<LD	N/A	N/A	N/A
		Canal Feedlot	3	T	<LD	104	<LD	N/A	N/A	N/A
		Río Gualaguay Pre-Ciudad	3	P	<LD	80	<LD	N/A	N/A	N/A
		Río Gualaguay Post-Ciudad	4	P	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Villa Larroque	4	T	DNC	35	40	N/A	N/A	N/A
		Urdinarraín	4	T	<LD	21	9	N/A	N/A	N/A
		Rosario del Tala	4	P	<LD	20	21	N/A	N/A	N/A
		Gob. Mansilla	4	T	<LD	DNC	DNC	N/A	N/A	N/A
		Aldea Asunción	4	T	8	32	26	N/A	N/A	N/A
		A° Arrecifes	4	T	<LD	138	DNC	N/A	N/A	N/A
		Río Gualaguay Pre-Ciudad	4	P	<LD	22	50	N/A	N/A	N/A
	AP	Rio Pilcomayo	1	T	58	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Paraguay (Lím)	1	T	9	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Monte Lindo	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Bermejo	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Paraguay (Des)	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Negro	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Categoría	Zona	Sitio	Campaña	Nivel	AGUA (fracción soluble - ng/L)					
					LAS	MON	SAL	TTC	OTC	CTC
	PAR	Rio Santa Lucía	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Feliciano	1	T	29	20	<LD	<LD	<LD	<LD
		Laguna Setubal	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Salado	1	T	<LD	115	<LD	32	<LD	<LD
		Rio Coronda	1	T	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Carcarañá	1	T	6	11	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río San Lorenzo	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	67	<LD
		Río Saladillo	1	T	16	<LD	<LD	<LD	26	<LD
	URU	A° Artalaz	1	P	21	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° La China	1	P	<LD	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD
		Pto. Campichuelo	1	P	<LD	<LD	15	<LD	<LD	<LD
		Ñandubaysal 2.5km	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Negro	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Guazu Guazuzito	1	P	9.2	<LD	10	<LD	<LD	<LD
		A° Cañada Grande	1	T	337	<LD	<LD	DNC	455	<LD
		A° Grande	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Cañada Grande	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	98	<LD
		A° Grande	2	T	<LD	126	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Cañada Grande	3	T	128	<LD	<LD	102	<LD	<LD
		A° Grande	3	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	BA	Canal 1	1	T	<LD	<LD	28	<LD	224	72
		Canal 2	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	40	<LD
		Rio 16	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Canal 3	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	222	<LD
		Rio 16	2	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
DEL	DEL	Parque Nacional	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Ensenada	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Nogoya	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Cle	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gualeguay	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Parque Nacional	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Ensenada	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Nogoya	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Cle	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gualeguay	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	DNC	<LD
		Parque Nacional	3	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Ensenada	3	P	<LD	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD
		Nogoya	3	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Cle	3	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gualeguay	3	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Parque Nacional	4	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Ensenada	4	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Nogoya	4	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Cle	4	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gualeguay	4	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

*Nivel (P: Principal; T: Tributario). **<LD (Menor al límite de detección), los limites correspondientes se observan en la Tabla 14; DNC (Detectable no cuantificable); N/A (No analizado).

MON resultó el ionóforo más detectado con el 41% de las muestras positivas ($p \leq 0,05$), y comparativamente en el mismo conjunto de datos LAS y SAL fueron menos frecuentes (23% y 21% respectivamente). Resultados con igual tendencia se publicaron en Canadá para 23 cursos de agua monitoreados próximos a zonas con actividades agrícolas de distinta intensidad, siendo MON el compuesto más detectado en un 34% de las muestras (Forrest et al., 2011). La diversificación de la producción animal en la región pampeana está alcanzando cuerpos de agua ubicados en el área de estudio (SENASA, 2018) como consecuencia del uso de los fármacos veterinarios como insumos para los sistemas intensivos de cría, mantenimiento y engorde animal. En particular, los niveles ambientales, en aguas, de los 3 ionóforos estudiados en orden decreciente fueron $[MON] > [SAL] > [LAS]$. En Argentina, MON y SAL han sido reportados entre los antibióticos más vendidos para la elaboración de alimentos balanceados (Hansen et al., 2009; Sarmah et al., 2006; Yoshida et al., 2007). Una evaluación de correlaciones múltiples permitió identificar que las concentraciones de ambos compuestos se asociaron ($p < 0.05$), y posiblemente, en función de su uso combinado en las prácticas de alimentación (Sarmah et al., 2006) y propiedades fisicoquímicas similares, su presencia en ambientes acuáticos ocurra de manera conjunta. En cambio, una menor incidencia de LAS podría estar relacionada a factores como menor volumen de uso y mayor susceptibilidad a fotólisis a través de longitudes de onda solares relevantes para el ambiente, con tiempos de vida media de aproximadamente 1 hora en ambientes acuáticos (Bak y Björklund, 2014; Bohn et al., 2013).

Las concentraciones de los ionóforos estudiados en agua se muestran en la Tabla 26. Independientemente de la frecuencia de detección, MON presentó en los sitios RS la media \pm SD (y mediana) regional más alta, de 51 ± 15 ng/L (y 4 ng/L), seguida de LAS y SAL con medias

regionales 12 ± 5 ng/L y 10 ± 3 ng/L respectivamente - ambas medianas estaban por debajo de LDM. Vale destacar que, a diferencia del comportamiento ambiental observado, MON se ha reportado a concentraciones menores que LAS o SAL en excrementos animales (Arikan et al., 2016; Biswas et al., 2012). Los valores medios para MON, en aguas superficiales de la región pampeana, fueron similares a otros estudios ambientales en distintos países (Bak y Björklund, 2014; Iglesias et al., 2012; Jaimes-correa et al., 2015; Lissemore et al., 2006; Sandoz et al., 2018) y de igual tendencia fue el máximo detectado (en un arroyo tributario del Gualeguay) de 176 ng/L.

Como se mencionó anteriormente (Sección 5.3.3.1), las concentraciones más bajas en la categoría RS indican que la distancia a los sitios de cría es un factor relevante que influye en los niveles de estos contaminantes emergentes en aguas, particularmente los sitios RS pueden recibir aportes desde los CP, acompañados de un efecto de dilución, y de escorrentías superficiales desde suelos agrícolas tratados con enmienda (Navarro et al., 2019). Además, como se discutió en el Capítulo 4 del presente trabajo, las aplicaciones agrícolas de estiércol líquido y desperdicios de aves de corral en campos de cultivo con fines de fertilización constituyen una fuente difusa de estos compuestos (Gange et al., 2017; Kim et al., 2010; Sun et al., 2013), donde en el Cordón Hortícola Platense, se ha verificado el uso de estas enmiendas sobre suelos, se han podido cuantificar hasta 6,6 $\mu\text{g/kg}$ de MON y 2,7 $\mu\text{g/kg}$ de SAL (Navarro et al., 2018).

La frecuencia de detección de antibióticos ionóforos en aguas de las subcuencas GUA y PAR fue superior al resto de las zonas RS monitoreadas. Ambas se encuentran en la provincia de Entre Ríos, que pertenece al núcleo pecuario de Argentina y concentran la mayor parte de la producción de huevos y pollos para consumo de carnes del país (Ministerio de Agricultura

Ganadería y Pesca de la Nación, 2019). Un análisis comparativo (Kruskal-Wallis) de las diferentes áreas estudiadas RS mostró que las concentraciones de LAS en la sección norte de la AP son más altas que las encontradas en los sitios de muestras de BA y GUA. Evaluando los perfiles y comportamientos, sectorizados de los antibióticos, se propone un vínculo entre LAS y las actividades avícolas, ya que fue el único compuesto detectado en los afluentes situados al norte de la sección AP, que cuenta con una baja pero sectorizada densidad de instalaciones avícolas, y no hubo más detecciones positivas hasta PAR y URU, donde aumentan las producciones de huevos y pollos de engorde (Gange et al., 2017). En contraste, la concentración de MON en las muestras de agua de GUA fue mayor que la encontrada en los sitios de muestreo AP y URU. Particularmente, MON posee un uso más genérico que los otros ionóforos, aplicándose en múltiples prácticas de cría animal, y es esperable se detección frecuente en un área de uso mixto tal como GUA (Kim y Carlson, 2006).

Se estudió la presencia de los antibióticos en las matrices sólidas asociadas a la columna de agua: los sólidos en suspensión (o material particulado) y el sedimento de fondo. En términos generales, la detección fue inferior a la observada en aguas. El compuesto más detectado nuevamente es MON, con una ocurrencia del 20% en SS y 23% en sedimentos, seguido por SAL y LAS (15% y 11% en SS; 15% y 3% en sedimentos). La OTC fue el antibiótico más detectado de la familia de las tetraciclinas, con una ocurrencia del 5% en SS y 2% en sedimentos.

En el caso de SS, tal como se discutió en la Sección 3.10.3, el método de análisis es extremadamente dependiente de la cantidad de material particulado filtrado en la muestra. Los LDM y LCM son 100 veces más altos, comparados con matrices equivalentes como sedimentos. Para muestras de aguas naturales, se ha llegado a medir un rango de SS de 16 a 3221 mg/L (y determinando así un rango de LDM para MON de 1,5 ng/g a 312 ng/g). De hecho,

en muchos de los casos, las concentraciones halladas están en torno a los valores de LCM, lo cual indica la necesidad de mejorar la sensibilidad para establecer un umbral de detección inferior o aplicar esta caracterización cuando se disponga de buena cantidad de material o migrar el análisis al agua total (discutido en la Sección 3.10.4). En la literatura, se encuentra que el estudio de antibióticos asociados a los SS es frecuente en muestras de descargas o efluentes de producción, en aguas con una alta carga de sólidos, donde no solo hay suficiente material para análisis y con ello conduce a límites analíticos inferiores, además, la carga asociada a estos sólidos más “crudos” presenta niveles de cuantificación superiores (Ben et al., 2013; Pan et al., 2011). En la Tabla 27 y Tabla 28 se pueden observar las concentraciones halladas de antibióticos en SS y sedimentos, respectivamente. Los rangos obtenidos para SS en arroyos tributarios (RS) varían desde 17-30 ng/g hasta 1596 ng/g (LAS), 3807 ng/g (MON) y 5294 ng/g (SAL) para ionóforos, mientras que para tetraciclinas el rango cuantificado se encontró entre 77 y 963 ng/g (OTC). En general, existen pocos datos referidos a la presencia de antibióticos en SS de aguas superficiales naturales (no efluentes), siendo la mayor parte de los datos publicados aplicados a efluentes líquidos o lagunas de tratamiento de establecimientos de producción. Sassman y Lee (2007) cuantifican un valor de 2000 ng/g de MON en la laguna de tratamiento de un *feedlot*, valor que se encuentra por debajo (aunque en el mismo orden de magnitud) de los valores hallados en aguas superficiales de la región pampeana (Sassman y Lee, 2007). Para tetraciclinas en SS se han llegado a cuantificar valores desde lo pocos ng/g hasta más de 36000 ng/g en muestras provenientes de la producción porcina (Pan et al., 2011).

Las concentraciones de antibióticos son dependientes de muchos factores que determinan la especiación y por ende la sorción de esta familia de antibióticos, como el pH, la materia

orgánica soluble, la fuerza iónica del medio y la composición de las partículas, entre otros (Wang y Wang, 2015). Las concentraciones de tetraciclinas cuantificadas en este trabajo tienen la particularidad de pertenecer a cuerpos de agua receptores que no representan efluentes crudos de establecimientos, ello se refleja en los niveles que son 10 y 100 veces inferiores a los valores de literatura. También sería necesario evaluar la estabilidad de las moléculas en función de la composición del agua según lo propuesto por Wang y Wang (2015), ya que podrían condicionar su adsorción a las partículas.

En los sedimentos, es destacable la baja frecuencia de detección para ionóforos y tetraciclinas en relación a la observada en aguas. Las tetraciclinas presentan mayor solubilidad en agua y bajos coeficientes de reparto asociados a fases sólidas como SS y sedimentos (Tabla 1), presentando un comportamiento esperable en los escenarios del presente trabajo. Por otra parte, Sandoz et al. (2018) también presenta detecciones superiores de MON en agua (100%) que en sedimentos (51%) en sistemas cercanos a un sitio de cría bovina. Estos resultados están en contraposición con lo esperado por evaluación de sus propiedades fisicoquímicas y en particular constantes de reparto como K_{oc} y K_{ow} (Tabla 1), se tiene conocimiento que son moléculas de alta hidrofobicidad y afinidad por matrices sólidas (Kim y Carlson, 2007a; Sandoz et al., 2018; Zhang et al., 2013).

Tabla 27. Concentraciones de antibióticos veterinarios analizados en la fracción particulada (sólidos en suspensión) de la columna de agua, de las aguas superficiales de la región pampeana. Se presenta el conjunto de datos completo seccionado por: la categoría, zona, sitio, campaña y nivel del curso de agua estudiado.

Categoría	Zona	Sitio	Campaña	Tipo	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN (F. particulada - ng/g)					
					LAS	MON	SAL	TTC	OTC	CTC
CP	CP	Canal MM S/N	1	T	<LD	584	DNC	<LD	DNC	<LD
		A° Chañar	1	T	434	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° S/N	1	T	<LD	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° S/N	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° S/N	3	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Colector 1	1	T	<LD	2870	<LD	<LD	116	<LD
		Colector 2	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Colector 1	2	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
RS	GUA	Río Guauguay Post-Ciudad	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Villa Larroque	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Urdinarraín	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rosario del Tala	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gob. Mansilla	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	197	<LD
		Aldea Asunción	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Arrecifes	1	T	<LD	3105	<LD	<LD	<LD	<LD
		Canal Feedlot	1	T	<LD	<LD	<LD	77	DNC	<LD
		Río Guauguay Pre-Ciudad	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río Guauguay Post-Ciudad	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Villa Larroque	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Urdinarraín	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rosario del Tala	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Aldea Asunción	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río Guauguay Post-Ciudad	3	P	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Villa Larroque	3	T	<LD	DNC	<LD	N/A	N/A	N/A
		Urdinarraín	3	T	<LD	1824	<LD	N/A	N/A	N/A
		Rosario del Tala	3	P	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Gob. Mansilla	3	T	<LD	3808	DNC	N/A	N/A	N/A
		Aldea Asunción	3	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Canal Feedlot	3	T	<LD	<LD	DNC	N/A	N/A	N/A
		Río Guauguay Pre-Ciudad	3	P	<LD	DNC	<LD	N/A	N/A	N/A
		Río Guauguay Post-Ciudad	4	P	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Villa Larroque	4	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Urdinarraín	4	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Rosario del Tala	4	P	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Gob. Mansilla	4	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Aldea Asunción	4	T	<LD	166	<LD	N/A	N/A	N/A
		A° Arrecifes	4	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Río Guauguay Pre-Ciudad	4	P	<LD	DNC	<LD	N/A	N/A	N/A
	AP	Río Pilcomayo	1	T	1596	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río Paraguay (Lím)	1	T	<LD	<LD	562	<LD	<LD	<LD
		A° Monte Lindo	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río Bermejo	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río Paraguay (Des)	1	T	DNC	<LD	3312	<LD	<LD	<LD
		Río Negro	1	T	<LD	3700	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río Santa Lucía	1	T	<LD	<LD	3113	<LD	<LD	<LD
	PAR	Río Feliciano	1	T	<LD	286	<LD	<LD	<LD	<LD
		Laguna Setubal	1	T	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Categoría	Zona	Sitio	Campaña	Tipo	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN (F. particulada - ng/g)					
					LAS	MON	SAL	TTC	OTC	CTC
		Rio Salado	1	T	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Coronda	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Carcarañá	1	T	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río San Lorenzo	1	T	DNC	<LD	2066	<LD	204	<LD
		Río Saladillo	1	T	<LD	<LD	2900	<LD	DNC	<LD
	URU	A° Artalaz	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° La China	1	P	<LD	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD
		Pto. Campichuelo	1	P	<LD	<LD	4294	<LD	<LD	<LD
		Ñandubaysal 2.5km	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Negro	1	P	DNC	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD
		Guazu Guazuzito	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Cañada Grande	1	T	610	2700	986	DNC	963	<LD
		A° Grande	1	T	<LD	1324	DNC	<LD	DNC	<LD
		A° Cañada Grande	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Grande	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Cañada Grande	3	T	<LD	<LD	<LD	<LD	DNC	<LD
		A° Grande	3	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	BA	Canal 1	1	T	<LD	<LD	<LD	DNC	<LD	<LD
		Canal 2	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio 16	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Canal 3	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio 16	2	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
DEL	DEL	Parque Nacional	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Ensenada	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Nogoya	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Cle	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gualeguay	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Parque Nacional	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Ensenada	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Nogoya	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Cle	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gualeguay	2	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Parque Nacional	3	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Ensenada	3	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Nogoya	3	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Cle	3	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gualeguay	3	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Parque Nacional	4	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Ensenada	4	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Nogoya	4	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Cle	4	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gualeguay	4	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

*Nivel (P: Principal; T: Tributario). **<LD (Menor al límite de detección), los límites correspondientes se observan en la Tabla 14; DNC (Detectable no cuantificable); N/A (No analizado).

Tabla 28. Concentraciones de antibióticos veterinarios analizados en sedimentos de fondo de la región pampeana. Se presenta el conjunto de datos completo seccionado por: la categoría, zona, sitio, campaña y nivel del curso de agua estudiado.

Categoría	Zona	Sitio	Campaña	Tipo	SEDIMENTO (ng/kg)					
					LAS	MON	SAL	TTC	OTC	CTC
CP	CP	Canal MM S/N	1	T	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		A° Chañar	1	T	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		A° S/N	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° S/N	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° S/N	3	T	<LD	142	DNC	<LD	<LD	<LD
		Colector 1	1	T	<LD	DNC	<LD	<LD	2213	4924
		Colector 2	1	T	<LD	13569	<LD	<LD	<LD	<LD
		Colector 1	2	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
RS	GUA	Río Gualaguay Post-Ciudad	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Villa Larroque	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Urdinarraín	1	T	<LD	<LD	<LD	37	<LD	<LD
		Rosario del Tala	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Gob. Mansilla	1	T	<LD	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD
		Aldea Asunción	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Arrecifes	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Canal Feedlot	1	T	<LD	388	156	<LD	<LD	<LD
		Río Gualaguay Pre-Ciudad	1	P	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río Gualaguay Post-Ciudad	2	P	<LD	219	<LD	<LD	<LD	<LD
		Villa Larroque	2	T	<LD	<LD	20	<LD	<LD	<LD
		Urdinarraín	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rosario del Tala	2	P	<LD	37	<LD	<LD	<LD	<LD
		Aldea Asunción	2	T	<LD	21	<LD	<LD	<LD	<LD
		Río Gualaguay Post-Ciudad	3	P	<LD	14164	<LD	N/A	N/A	N/A
		Villa Larroque	3	T	<LD	344	<LD	N/A	N/A	N/A
		Urdinarraín	3	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Rosario del Tala	3	P	<LD	54	<LD	N/A	N/A	N/A
		Gob. Mansilla	3	T	<LD	26	<LD	N/A	N/A	N/A
		Aldea Asunción	3	T	<LD	242	<LD	N/A	N/A	N/A
		Canal Feedlot	3	T	<LD	146	<LD	N/A	N/A	N/A
		Río Gualaguay Pre-Ciudad	3	P	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Río Gualaguay Post-Ciudad	4	P	<LD	24	23	N/A	N/A	N/A
		Villa Larroque	4	T	75	79	15	N/A	N/A	N/A
		Urdinarraín	4	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Rosario del Tala	4	P	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Gob. Mansilla	4	T	<LD	52	<LD	N/A	N/A	N/A
		Aldea Asunción	4	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		A° Arrecifes	4	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
		Río Gualaguay Pre-Ciudad	4	P	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
	AP	Rio Pilcomayo	1	T	95	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Paraguay (Lím)	1	T	<LD	<LD	DNC	<LD	<LD	<LD
		A° Monte Lindo	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Bermejo	1	T	<LD	<LD	66	<LD	<LD	<LD
		Rio Paraguay (Des)	1	T	<LD	<LD	223	<LD	<LD	<LD
		Rio Negro	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Santa Lucía	1	T	<LD	<LD	DNC	<LD	<LD	<LD
	PAR	Rio Feliciano	1	T	DNC	169	<LD	<LD	<LD	<LD
		Laguna Setubal	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Salado	1	T	<LD	DNC	<LD	<LD	<LD	<LD

Categoría	Zona	Sitio	Campaña	Tipo	SEDIMENTO (ng/kg)					
					LAS	MON	SAL	TTC	OTC	CTC
		Rio Coronda	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio Carcarañá	1	T	DNC	55	34	<LD	<LD	<LD
		Río San Lorenzo	1	T	<LD	<LD	DNC	<LD	<LD	<LD
		Río Saladillo	1	T	<LD	DNC	113	<LD	<LD	<LD
	URU	A° Artalaz	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		A° La China	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Pto. Campichuelo	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Ñandubaysal 2.5km	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Rio Negro	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Guazu Guazuzito	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		A° Cañada Grande	1	T	<LD	5	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Grande	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Cañada Grande	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Grande	2	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Cañada Grande	3	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		A° Grande	3	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	BA	Canal 1	1	T	<LD	<LD	358	100	<LD	<LD
		Canal 2	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Rio 16	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
		Canal 3	1	T	<LD	<LD	<LD	<LD	8013	<LD
		Rio 16	2	T	<LD	<LD	<LD	N/A	N/A	N/A
DEL	DEL	Parque Nacional	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Ensenada	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Nogoya	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Cle	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Guauguay	1	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Parque Nacional	2	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Ensenada	2	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Nogoya	2	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Cle	2	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Guauguay	2	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Parque Nacional	3	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Ensenada	3	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Nogoya	3	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Cle	3	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Guauguay	3	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Parque Nacional	4	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Ensenada	4	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Nogoya	4	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Cle	4	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Guauguay	4	P	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

*Nivel (P: Principal; T: Tributario). **<LD (Menor al límite de detección), los límites correspondientes se observan en la Tabla 14; DNC (Detectable no cuantificable); N/A (No analizado).

En cuanto a los niveles de ionóforos, la concentración más alta del estudio fue de 14163 ng/kg (MON), encontrada en un sedimento del río Guauguay (post-ciudad de Guauguay). Es importante y preocupante este valor que se da en un cuerpo de agua con un caudal de 320 m³/seg, correspondiente a un sector de uso recreativo, en cercanías de 1 km de la producción más cercana. El valor supera en 40 veces al máximo registrado para SAL en un arroyo de la zona BA, poniendo nuevamente en relevancia a MON como el compuesto presente en mayor proporción en todas las matrices. Las concentraciones son menores, pero del mismo orden a las publicadas por Kim y Carlson (2006) para sedimentos de zonas agrícolas con valores máximos de 31500 ng/kg, posiblemente por no recibir directamente escorrentía.

5.3.3.3. Patrones estacionales. Estudio de una subcuenca de usos mixtos (Guauguay)

En el marco del proyecto PICT2014-0919 que involucró a la región del Delta entrerriano la sub-cuenca baja del río Guauguay se estudió en diferentes estaciones a lo largo del año. El área corresponde a una sub-cuenca de uso mixto, representativa de la región pampeana. Si bien predomina la producción avícola – pollos de engorde en la zona del Uruguay y huevos en la zona de Paraná -, la región cuenta con áreas dedicadas al ganado bovino (sitios de engorde y producción lechera), además de grandes áreas dedicadas al cultivo extensivo de variedades como soja, trigo, entre otros (Castillo et al., 2016; Engler et al., 2008). Existen pocos trabajos dedicados al estudio de la contaminación por antibióticos veterinarios en regiones de uso mixto de suelo, en comparación con estudios dedicados a casos particulares (Fairbairn et al., 2015). Este enfoque resulta interesante para aportar información sobre la ocurrencia y distribución de este tipo de compuestos en un escenario de múltiples fuentes

difusas, siendo clave para el desarrollo de estrategias de monitoreo y gestión de los sistemas acuáticos (Couperus et al., 2016). El estudio temporal, además, permite identificar la presencia de patrones tanto en relación a las prácticas productivas o a las condiciones ambientales que pueden incidir en la presencia y distribución de estos compuestos en las matrices ambientales, y sus consecuencias asociadas. Se realizaron entonces 4 campañas de monitoreo siguiendo la secuencia: Primavera – Otoño – Invierno – Verano, en 9 sitios de muestreo, de los cuales 3 se realizaron en sobre el cuerpo principal del río Gualaguay, aguas arriba de la sub-cuenca y aguas abajo, antes y después de la ciudad de Gualaguay. La forma de asignación de nombres de los arroyos estudiados correspondió con la localidad más cercana, dado que en muchos de los casos los cursos de aguas no tenían nombre propio. Durante las campañas 2, 3 y 4, algunos de los sitios de muestreo, de manera alternada, resultaron inaccesibles debido a las condiciones de los caminos. Además, por cuestiones operativas, no se analizaron tetraciclinas en las campañas 3 y 4.

En la Tabla 26, Tabla 27 y Tabla 28 se presentan las concentraciones de antibióticos halladas en las distintas matrices ambientales de estudio “en detalle”. En agua, las frecuencias de detección de ionóforos siguieron el patrón regional, siendo MON y SAL los compuestos más detectados (63.3% y 40.0% respectivamente). En el caso de las tetraciclinas (campañas 1 y 2), OTC fue el compuesto más detectado con un 21% de resultados positivos, únicamente en arroyos tributarios (no hubo ocurrencia en el cuerpo principal del Gualaguay) y durante la campaña 1 correspondiente a invierno. LAS, TTC, OTC y CTC no se detectaron en la campaña 2 (otoño). Aunque se han propuesto prácticas de rotación de uso de ionóforos para prevenir efectos a largo plazo como resistencia bacteriana a los antibióticos en los animales (Stanev et al., 2015), MON podría estar exhibiendo un uso continuado a lo largo del año ya que se

detectó en todas las estaciones. Además, se observó que domina la carga másica total de los antibióticos analizados en cada estación.

En cuanto a las matrices sólidas, MON nuevamente resulta ser el fármaco más relevante, con un 20% de detección en SS y 47% en sedimentos. El máximo de MON en sedimentos de este estudio se halló en el sitio 9 (río Gualeguay post-ciudad), con una concentración de 14163 ng/kg durante la campaña de invierno donde también se observaron mayores concentraciones en agua. El sitio se encuentra cercano a la desembocadura del río Gualeguay sobre el delta del Paraná, siendo entonces una fuente de MON para el humedal (Figura 5). La concentración media de MON en sedimentos fue de 527 ± 2577 ng/kg con una mediana por debajo del LDM (12 ng/kg), este resultado se encuentra en el orden de lo reportado por Kim y Carlson (2006, 2007) – cuyos máximos fueron de 14200 y 31500 ng/kg. En cuanto a SAL, solo fue cuantificable en 1 muestra, presentando otras 3 detecciones por debajo del LCM. LAS fue cuantificado únicamente en el sedimento del muestreo de verano del sitio 2 (Villa Larroque), sin detección en otras campañas ni en los SS. El caso particular de las tetraciclinas, su detección fue (junto a aguas) relevante en el sitio 8, el cual se encuentra cercano a zonas de cría de ganado vacuno. En el sitio, se observó una co-ocurrencia de MON, SAL, TTC, OTC (SS) y CTC (aguas), evidenciando la influencia de la actividad sobre la calidad del agua, tal como se discutió para los cuerpos CP en la Sección 5.3.3.1.

La concentración de MON en aguas se encontró significativamente mayor en el muestreo de invierno, en comparación con la primavera y el otoño. En el caso de SAL, sus mayores detecciones fueron en verano, a pesar de que las concentraciones no presentaron diferencias significativas entre las estaciones. Autores como Kim y Carlson (2006) y Jaimes-Correa et al. (2015) han reportado variaciones temporales significativas en los niveles de antibióticos,

asociando su incremento con la época de lluvias, y por ende con mayores pulsos de escorrentía movilizand material desde los suelos, en concordancia con lo observado en este estudio para el caso de SAL (mayores detecciones en verano), sin embargo, para MON, se observó un resultado opuesto. La época de invierno corresponde con la de menores lluvias, con el promedio mensual de precipitaciones más bajo – los valores promedio en los meses de invierno son la mitad del promedio de otras temporadas (Figura 40); por lo que su movilización no se debería a procesos de escorrentía seguidos, sino a eventos particulares de lluvia. Por otra parte, el pH en las campañas de otoño e invierno presentaron valores promedio de 7,0 pH, siendo este un factor crítico que afecta la solubilidad puede haber favorecido la solubilidad de MON en esas estaciones frente a las condiciones de primavera y verano, con valores de pHs significativamente mayores. Además, factores climáticos estacionales, como una menor radiación y temperaturas, disminuyen la velocidad de fotólisis y la degradación microbiana que degradan la MON (Sun et al., 2014; Yao et al., 2013). Según la tendencia en los resultados de los sedimentos de fondo, los factores de contorno también estarían incidiendo sobre las concentraciones en esta matriz. Para MON, las mayores concentraciones se midieron en invierno, donde además de las condiciones más estables para la molécula, se observan menores condiciones de flujo. Este fenómeno puede favorecer la sedimentación de los SS cargados con el antibiótico provenientes de la escorrentía, y ello se verá reflejado en un incremento su concentración en el sedimento (Kim y Carlson, 2006).

Tal como se discutió anteriormente, para MON se ha identificado un comportamiento ubicuo en cuerpos de agua superficial de la región, además de presentar concentraciones superiores a otros fármacos con usos similares en la producción animal. La ocurrencia del 88% en las campañas de invierno y verano en las aguas de una subcuenca representativa de las múltiples

actividades productivas de Argentina, es indicadora no solo de la magnitud de uso de esta molécula (al punto de detectarla en un cuerpo caudaloso como el río Gualeguay), sino además la falta de especificidad sobre su ingreso a los sistemas acuáticos. Las concentraciones halladas en los distintos ríos y arroyos estudiados, que van desde los pocos ppt hasta niveles del orden de las ppb, tanto en aguas como en sedimentos de fondo de los tributarios y del cuerpo principal del río Gualeguay, son alertas que deberían tomarse en cuenta para próximas legislaciones que tiendan a evitar la evolución de este compuesto en un contaminante pseudo-persistente, como ha ocurrido con otros contaminantes agrícolas para la misma región como glifosato (Primost et al., 2017). La co-ocurrencia de otros fármacos veterinarios junto a MON (como SAL, TTC, OTC (SS) y CTC (aguas) en el sitio 8) pone en evidencia la diversificación en el ingreso de contaminantes emergentes consecuencia de las actividades pecuarias dependientes de estos insumos.

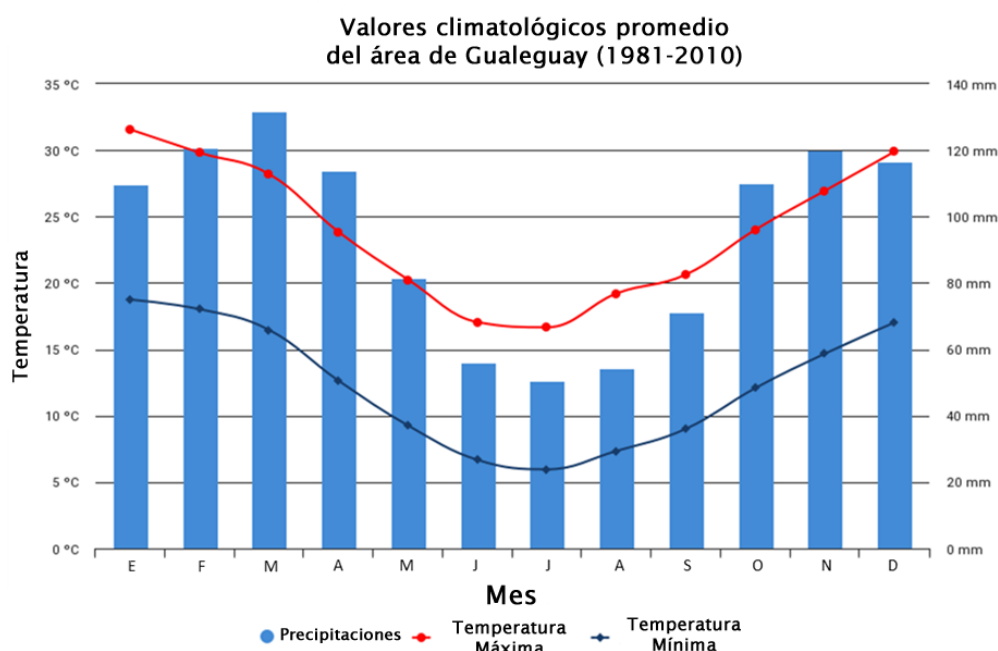


Figura 40. Promedio mensual de precipitación, valores de temperatura máxima y mínima para la sección de Gualeguay (De: www.smn.gob.ar). En la figura, la temperatura máxima (curva roja) y mínima (curva azul) (°C) se representa en la ordenada izquierda y el nivel de precipitación promedio (barras azules) se representa en la ordenada derecha para cada uno de los meses indicados en la abscisa.

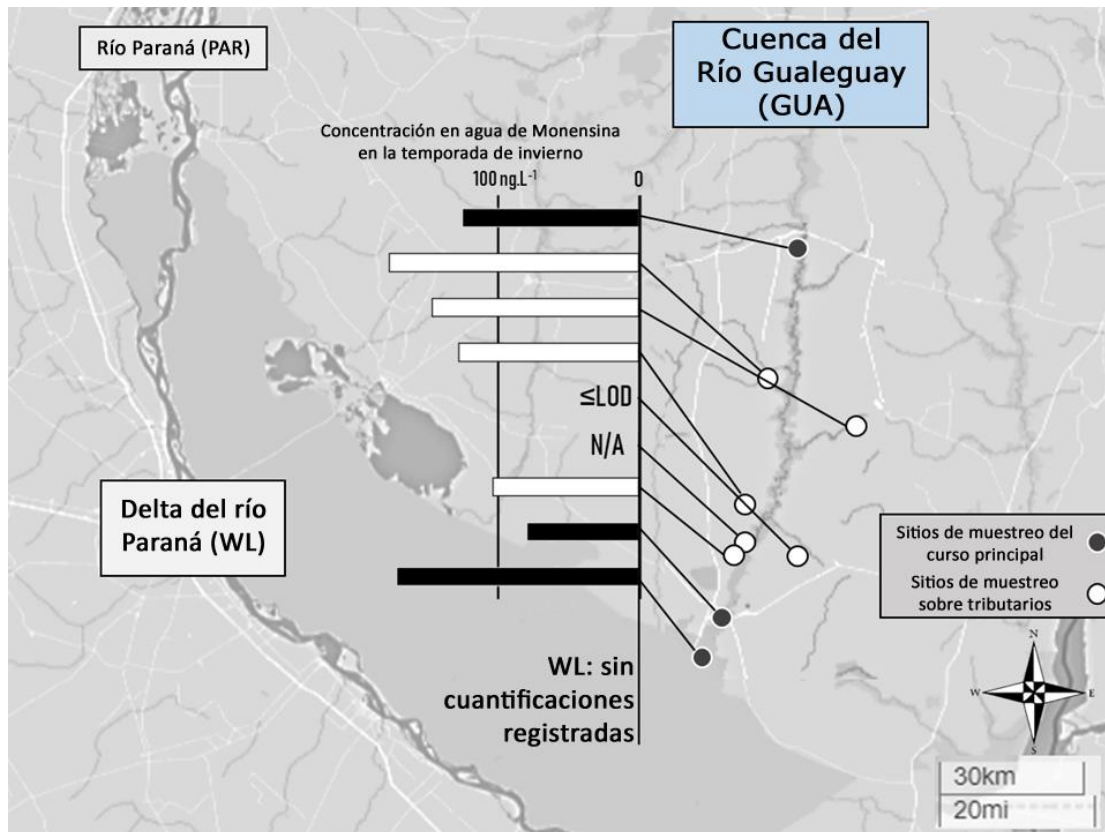


Figura 41. Concentraciones invernales de MON en muestras acuosas de la cuenca del río Guaqueguay y delta del río Paraná. La contribución de la sección GUA es especialmente notable en las muestras del curso principal (barras negras) en la salida del río hacia el humedal.

5.3.4. Distribución y reparto de antibióticos veterinarios en ecosistemas acuáticos y factores que los influyen.

5.3.4.1. Reparto en la columna de agua y sedimento de cuerpos de agua de la región pampeana (CP y RS)

El análisis de las concentraciones de los 3 ionóforos en aguas de los sitios RS indica que son significativamente inferiores a las presentes en SS; mientras que para sedimentos de fondo no se diferenciaron respecto a los otros compartimentos ambientales. Esto se aleja del escenario mencionado anteriormente (Kim y Carlson, 2006), donde tales niveles en sedimentos fueron significativamente superiores a las muestras de agua (Kim y Carlson, 2007b; Sassman y Lee, 2007). Debido a la baja frecuencia de detección para la mayoría de los

compuestos en sedimentos de fondo, los análisis estadísticos comparativos entre sitios de muestreo no pudieron aplicarse por el bajo número de observaciones positivas. Se informan los valores detectados para los compuestos estudiados en la Tabla 26, Tabla 27 y Tabla 28. Excepcionalmente para el caso de MON, dado que su ocurrencia fue superior al 20%, se realizó un análisis KW, obteniéndose que no existen diferencias entre las concentraciones del SS y sedimentos.

Tabla 29. Valores medios de pseudo-coeficientes de partición obtenidos (en L/kg) de acuerdo a las relaciones C_{sed} (ng/kg)/ C_{agua} (ng/L) y C_{ss} (ng/kg)/ C_{agua} (ng/L), para las muestras ambientales estudiadas.

Analito	Kd	C_{sed}/C_{Aq}	C_{ss}/C_{Aq}
LAS	Media	21,5	15524
	Rango	1,64-41,4	1812-27517
MON	Media	15,4	14421
	Rango	0,08-82,6	125-68092
SAL	Media	11,2	96301
	Rango	0,35-20,3	6,78-284377
OTC	Media	30,6	-
	Rango	25,2-36,0	-

Se realizó una estimación de pseudo-coeficientes de reparto entre la fase sólida y la fase acuosa (Tabla 29), sobre los resultados obtenidos en la columna de agua, con el objetivo de comparar estos parámetros de comportamiento ambiental característicos para escenarios de Argentina frente a otros datos publicados en sistemas naturales. Los cuerpos de agua en movimiento no se consideran en estado de “equilibrio” al ser sistemas con flujo en un sentido preferencial. Estos coeficientes dependen exclusivamente de las condiciones específicas de la toma de muestra (tipo y forma de colección de la muestra, sitio específico de colección, condiciones del entorno), sin embargo, su determinación puede ayudar a un mejor entendimiento de la distribución de los fármacos en las condiciones estudiadas y en estado real (Fairbairn et al., 2015; Kim y Carlson, 2007b, 2006). Los coeficientes se calcularon de

acuerdo a la Ecuación 1 Ecuación 2 y Ecuación 3, obteniendo un Kd en relación al sedimento de fondo y otro respecto a los SS.

$$K_{d-sed} = \frac{C_{sed}}{C_{Aq}}$$

Ecuación 2.

$$K_{d-ss} = \frac{C_{ss}}{C_{Aq}}$$

Ecuación 3.

Los resultados se detallan en la Tabla 29. Los valores obtenidos para los K_{d-sed} en todos los casos (0,08-82,6 L/kg) son inferiores a los reportados por otros autores para sedimentos de fondo en cuerpos de agua receptores de escorrentía agrícola, con valores del orden de 680-10248 L/kg para MON, 446-8230 L/kg para SAL (Kim y Carlson, 2006) y 290-1030 L/kg para OTC (Kim y Carlson, 2007b). En las condiciones ambientales específicas de este trabajo, los resultados muestran una mayor ocurrencia de antibióticos en la fracción soluble respecto a la detección en matrices sólidas, de manera contraria a lo esperado en función de sus propiedades fisicoquímicas. Fairbairn et al. (2015) demuestra que la variación de K_{d-sed} está controlada parcialmente por las concentraciones observadas en agua: cambios significativos en la concentración de MON en fase soluble debido a variaciones espaciales o temporales, provocan cambios en los K_d observados, mientras que cambios similares en los sedimentos no afectan significativamente el cálculo de K_d. El autor propone que los resultados sustentan la hipótesis de condiciones de “no-equilibrio” en los sistemas acuáticos, explicando así las discrepancias con valores teóricos. Los valores calculados de K_{d-sed}, en el presente estudio, sí se corresponden en términos de órdenes de magnitud con los estudiados para más de 10 suelos con distintas características en la composición de arcillas, materia orgánica, entre otras. En condiciones controladas de laboratorio, han reportado Sassman y Lee los K_d de LAS y MON, que se encontraron en el rango de 10,8-210 L/kg y 0,9-78 L/kg. En este sentido,

algunos autores discuten la falta de representatividad que poseen algunos parámetros como K_{ow} para explicar la distribución de compuestos orgánicos en relación a los sedimentos, especialmente en casos como los antibióticos estudiados donde la interacción con las fases sólidas no solo involucra interacciones hidrofóbicas, sino que además pueden ocurrir fenómenos de intercambio iónico, complejación con minerales, enlaces de hidrógeno, entre otros, que dependerán de las condiciones específicas del medio (pH, fuerza iónica del medio, etc.) (Fairbairn et al., 2015).

Los K_{d-ss} presentaron valores significativamente superiores a los K_{d-sed} , con medias de 15524, 14421 y 96301 L/kg para LAS, MON y SAL respectivamente. Estos valores se corresponden a los rangos de valores mencionados por Kim y Carlson (2006) para distribución sobre sedimentos. Estos autores indican que los SS pueden ser los responsables de la mayor concentración de ionóforos en sedimentos dado que los niveles de MON y SAL son superiores en condiciones de bajo flujo, donde las partículas tienden a depositarse. En el presente trabajo, con las estimaciones realizadas en las condiciones específicas de muestreo, los K_{d-ss} resultaron más próximos a los esperados que los K_{d-sed} , en relación a las propiedades fisicoquímicas descritas y publicadas para este tipo de compuestos. Conjuntamente considerando un fenómeno superficial como la adsorción, se espera que la transferencia de materia sea mayor sobre la superficie específica de intercambio superior de la partícula en suspensión, frente al mismo fenómeno para una partícula de sedimento (Voice y Weber, 1983). En este sentido, podría proponerse para caracterizar mejor el reparto desde el punto de vista del sedimento de fondo, el estudio de la distribución de antibióticos en el agua de poro de los sedimentos, como un procedimiento de mejor aproximación para estimar el reparto entre ambas fases de ese compartimento ambiental (Xu et al., 2014).

El estudio de los sedimentos de fondo es de importancia en relación a este tipo de contaminantes en particular, dado que en parte la resistencia microbiana a antibióticos se origina en los sedimentos al incidir sobre la fauna bentónica (Kim y Carlson, 2007a). Si bien las concentraciones en agua presentan un panorama amplio de alcance y con un rol relevante en el transporte de estos contaminantes en los ecosistemas acuáticos de la región, dado el comportamiento individual que presentan los compuestos en relación a las condiciones fisicoquímicas del medio. Si bien han sido pocas las detecciones en los sólidos es importante incluir el estudio de sedimentos para poder describir la distribución específica en cada ecosistema acuático.

Por otra parte, el análisis de los SS resulta de interés para describir la distribución de estos antibióticos de acuerdo al tipo de agua, y puede aportar información acerca de la movilidad de estos compuestos en los ecosistemas acuáticos. El aporte de la fase particulada a la columna de agua en términos máxicos, frente a las concentraciones observadas en aguas, indicó una relevancia variable. Calculando la carga total de antibióticos en la columna de agua (Ecuación 4), en los casos que presentaron concentraciones cuantificables en ambas fracciones (soluble y particulada), se observan aportes que van desde el 5 al 90% de los ionóforos en el agua. No se observaron tendencias entre estas variaciones del aporte del particulado respecto a los sitios de estudio o a la estacionalidad del monitoreo. Incluso en los CP, el aporte de MON por partículas en el sitio “Canal MM” (Córdoba) fue del 28%, mientras que en el “Colector 1” (Buenos Aires) el aporte fue del 78%. Como se mencionó en la discusión sobre el ensayo de escorrentía (capítulo 4), se propone avanzar en el estudio de las fracciones soluble y particulada de manera independiente, a fines de caracterizar el ingreso de estos

antibióticos y evaluar cómo esa distribución afecta la movilidad de los mismos una vez que alcanzan un cuerpo de agua superficial.

$$Carga\ total = C_{aq} \left(\frac{ng}{L} \right) + C_{ss} \left(\frac{ng}{g} \right) \times SS \left(\frac{g}{L} \right)$$

Ecuación 4.

Conociendo la variabilidad de los sistemas agua-partícula, y de acuerdo a la particularidad de cada sitio, pueden evaluarse estrategias para la determinación de antibióticos que respondan en función de los objetivos deseados. Por un lado, pueden realizarse análisis de agua total (fase soluble + particulada) tal como proponen otros autores para compuestos con comportamientos equivalentes (Mac Loughlin et al., 2020), que a fines exploratorios presenta ventajas como las discutidas en el Sección 3.10.4; o estudiar punto a punto la distribución entre las dos fases, tal que se puede lograr estimar su compartimentalización y poder optimizar estrategias específicas para próximos estudios por ejemplo, ecotoxicológicos (como la evaluación de la biodisponibilidad) o de resistencia microbiana, dado que los sólidos han sido reportados como principales concentradores y transportadores genes de resistencia a antibióticos (Barrón et al., 2018).

5.3.4.2. Relaciones entre la dimensión de los cuerpos de agua y las concentraciones de fármacos veterinarios.

Las muestras de la clasificación de RS se sub-agruparon de acuerdo al caudal de los cuerpos de agua monitoreados (Dirección Hidráulica de Entre Ríos, 2018). No se obtuvieron concentraciones cuantificables de tetraciclinas en los cuerpos principales estudiados,

ocurriendo todas en cursos de menor caudal. Dado que las concentraciones en los CP fueron menores que para los ionóforos, podría esperarse que la dilución en ríos como el Gualeguay determine que las concentraciones no sean cuantificables, al menos para las metodologías aplicadas en el presente trabajo. Por otra parte, las concentraciones de ionóforos en cursos caudalosos (como el Gualeguay, el Uruguay, entre otros) no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a los arroyos o tributarios analizados (Figura 42). Es importante destacar que en el caso de MON y SAL, se determinaron en niveles cuantificables (las concentraciones medias fueron 27 ng/L y 5 ng/L respectivamente) en muestras de un río principal caudaloso como el río Gualeguay, con un caudal promedio de 320 m³/s (Ministerio del Interior de la Nación, 2019), estos resultados no solo indica la relevancia de la carga másica que recibe de estos fármacos, sino que además determinan una contribución de antibióticos al delta del río Paraná (Figura 41).

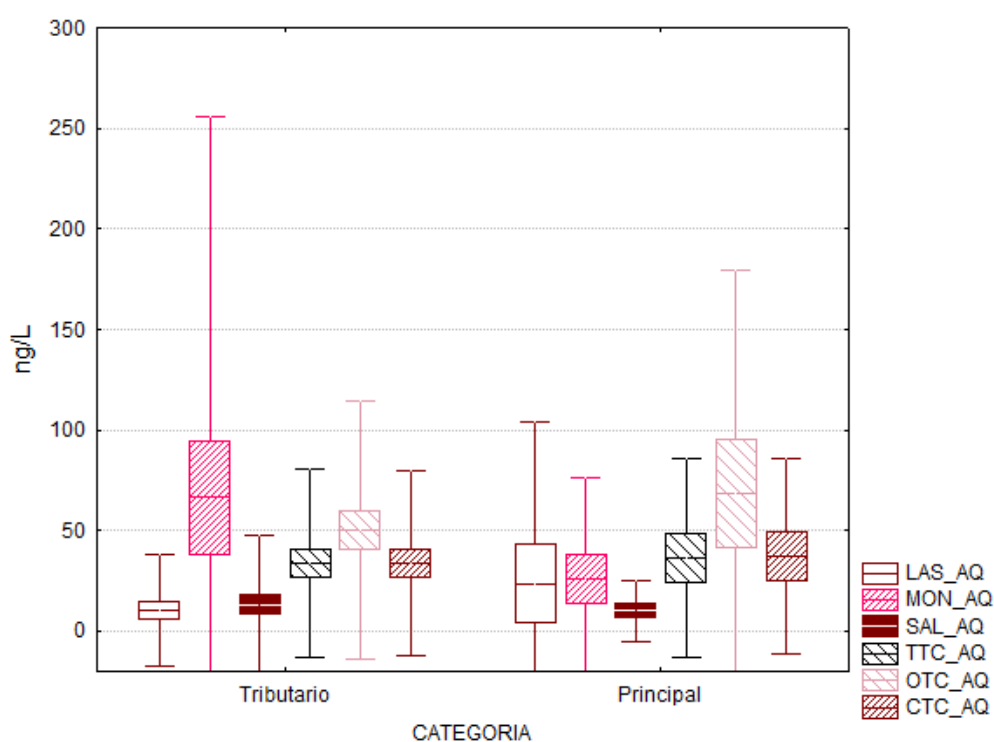


Figura 42. Concentraciones de antibióticos diferenciadas por la dimensión del cuerpo de agua estudiado (tributarios o cuerpos principales).

5.3.4.3. Relaciones entre calidad de aguas naturales y concentraciones de ionóforos.

Se realizó un análisis de correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos de las aguas superficiales y las concentraciones de antibióticos (Tabla 24 y Tabla 26). Las probabilidades (p) y los coeficientes correspondientes a cada correlación se presentan en la Tabla 30. Debido a los bajos porcentajes de detección, las correlaciones estudiadas se realizaron sobre los valores cuantificables de los antibióticos en sus respectivas matrices, exceptuando el caso de MON donde también se analizó el conjunto completo de datos. Se tratarán las correlaciones significativas para un p valor $\leq 0,05$.

Una de las relaciones destacables involucra a los SS con la concentración de LAS, MON, SAL y OTC. Si bien en la detección y en el aporte a la columna de agua, las concentraciones no son relevantes, algunos autores proponen que el aporte principal de antibióticos podría deberse al arrastre de partículas cargadas desde distintas fuentes (Kim y Carlson, 2006). Las concentraciones de MON y SAL (\geq LCM) también se asociaron positivamente a la DQO del agua. En este caso la materia orgánica disuelta favorece la movilización de antibióticos desde la fase soluble, y, por lo tanto, su transferencia desde las matrices sólidas (Hussain y Prasher, 2011; Tolls, 2001).

La especiación química de los antibióticos ionóforos se vincula estrictamente con el pH y la presencia de cationes en los medios acuosos (Sun et al., 2016), que condicionan el equilibrio de sorción. Ambos fenómenos son consistentes con los resultados obtenidos.

Tabla 30. Coeficientes de correlación de Spearman.

Correlación de Spearman: Coeficientes\probabilidades																				
	T	pH	CE (uS/cm)	OD (mg/L)	STS (mg/L)	DQO (mg/L)	LAS (AQ)	MON (AQ)	SAL (AQ)	TTC (AQ)	OTC (AQ)	CTC (AQ)	LAS (MP)	MON (MP)	SAL (MP)	OTC (MP)	LAS (SED)	MON (SED)	SAL (SED)	OTC (MP)
T	1.00	0.89	0.25	0.33	0.64	0.78	0.49	0.04	0.88	1.00	0.40	0.48	0.89	0.05	0.14	0.16	sd	0.39	0.26	0.37
pH	-0.02	1.00	0.00	0.00	0.66	0.15	0.52	0.13	0.38	0.84	0.05	0.48	0.43	0.05	0.12	0.49	sd	0.60	0.33	0.89
CE (uS/cm)	-0.14	0.36	1.00	0.74	0.38	0.34	0.21	0.81	0.01	0.32	0.40	0.16	0.61	0.26	0.14	1.00	sd	0.34	0.41	0.26
OD (mg/L)	-0.14	0.69	0.05	1.00	0.37	0.06	0.17	0.36	0.52	0.84	0.00	sd	0.21	0.64	0.01	0.73	sd	0.95	0.96	sd
STS (mg/L)	-0.06	-0.06	0.11	-0.13	1.00	0.00	0.05	0.00	0.01	0.23	0.05	0.16	0.19	0.73	0.21	0.32	sd	0.00	0.51	0.26
DQO (mg/L)	-0.05	-0.23	0.15	-0.37	0.45	1.00	0.49	0.03	0.00	sd	0.38	sd	0.16	0.69	0.42	sd	sd	0.28	0.56	0.48
LAS (AQ)	-0.19	-0.18	0.35	-0.41	0.50	0.26	1.00	0.34	0.34	sd	0.17	sd	0.48	0.69	0.49	sd	sd	0.69	0.33	sd
MON (AQ)	-0.37	-0.28	0.05	-0.19	0.51	0.49	0.36	1.00	0.09	0.48	0.16	0.16	0.48	0.06	0.48	sd	sd	0.40	0.37	0.33
SAL (AQ)	-0.04	0.24	0.62	-0.22	0.60	0.78	0.43	0.48	1.00	sd	0.73	0.16	sd	0.69	0.16	sd	sd	0.83	0.48	sd
TTC (AQ)	0.00	-0.10	-0.50	-0.10	0.60	sd	-1.00	0.50	-1.00	1.00	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd
OTC (AQ)	0.27	-0.58	0.25	-0.95	0.59	0.36	0.80	0.70	0.20	sd	1.00	sd	sd	0.48	0.17	0.49	sd	sd	0.48	0.89
CTC (AQ)	0.50	0.50	1.00	sd	1.00	1.00	sd	1.00	1.00	sd	-1.00	1.00	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd
LAS (MP)	0.06	-0.32	0.19	-0.48	0.50	1.00	0.50	0.50	sd	-1.00	1.00	sd	1.00	sd	sd	sd	sd	sd	1.00	sd
MON (MP)	-0.52	-0.54	0.31	-0.14	-0.09	0.15	0.20	0.64	-0.20	sd	-0.50	sd	1.00	1.00	0.48	sd	sd	0.16	sd	sd
SAL (MP)	0.50	0.53	-0.49	0.75	-0.42	-0.40	-0.40	-0.50	-1.00	sd	-0.80	sd	-1.00	0.50	1.00	sd	sd	sd	0.22	sd
OTC (MP)	0.70	-0.41	0.00	-0.20	-0.50	-1.00	sd	1.00	1.00	-1.00	0.40	1.00	1.00	-1.00	-1.00	1.00	sd	sd	sd	sd
LAS (SED)	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	1.00	sd	1.00	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	1.00	sd	sd	sd
MON (SED)	-0.23	-0.14	-0.25	0.02	0.67	0.32	0.20	0.26	0.12	1.00	1.00	sd	sd	-1.00	-1.00	-1.00	sd	1.00	0.33	sd
SAL (SED)	-0.40	-0.35	0.29	0.02	0.24	-0.35	0.87	0.63	-0.50	1.00	0.50	1.00	0.00	sd	0.67	-1.00	sd	0.87	1.00	sd
OTC (MP)	0.63	-0.11	0.74	sd	0.74	0.50	sd	0.87	1.00	sd	0.11	1.00	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	1.00

Los valores de concentración de MON en los SS se correlacionaron de manera inversa con el pH de las muestras de agua. Según algunos autores, se espera una disminución de K_d cuando el pH aumenta, en el rango de 4 a 8.5 que es contrario a lo esperado para moléculas con grupos carboxilatos terminales como los antibióticos ionóforos (Hussain y Prasher, 2011; Sassman y Lee, 2007). Específicamente, tal como se discute en la Sección 1.2.2, un estudio sobre suelos de la región indica un máximo de solubilidad a $\text{pH} = 7$ donde predomina la especie $[\text{MON}^-]$, mientras que en zona de pH entre 4 y 7 se favorece la especie protonada $[\text{MON-H}]^+$ y a $\text{pH} > 7$ toma relevancia la complejación con cationes, como $[\text{MON-Na}^+]$, siendo estos últimos menos solubles. Además, al incrementar el pH, la ionización y repulsión de los grupos ácidos superficiales de la materia orgánica favorecen su disolución, generando un nuevo equilibrio de reparto para los complejos de $[\text{MON-Na}^+]$, promoviendo su desorción y por ende, su movilidad (Doydora et al., 2017). Por otra parte, las concentraciones de SAL en agua correlacionaron con la conductividad eléctrica del agua, por lo que el entorno iónico efectivamente afecta la solubilidad de la molécula (y por ende el transporte). Analizando el conjunto completo de datos para MON (45% de cuantificaciones), se encuentra una relación positiva entre el pH y las concentraciones en la fracción soluble del agua. De manera inversa a lo discutido para los SS, el aumento de pH favorece la especiación hacia formas ionizadas de MON, las cuales tienen mayor afinidad por la fracción soluble en torno a $\text{pH}=7$ de aguas naturales (Sun et al., 2016). En relación a las tetraciclinas, debido a las bajas detecciones, solo se trabajó con OTC. La misma presentó correlaciones con los SS, de manera análoga a lo observado para ionóforos, y una relación inversa con el OD – coeficiente de Spearman = -0.95 –, indicando una mayor concentración en sitios anóxicos (y por ende menor OD). La OTC también presenta una correlación negativa con el pH, notando la relevancia de la especiación química en la prevalencia por la fase soluble a mayores pH (Wang y Wang, 2015).

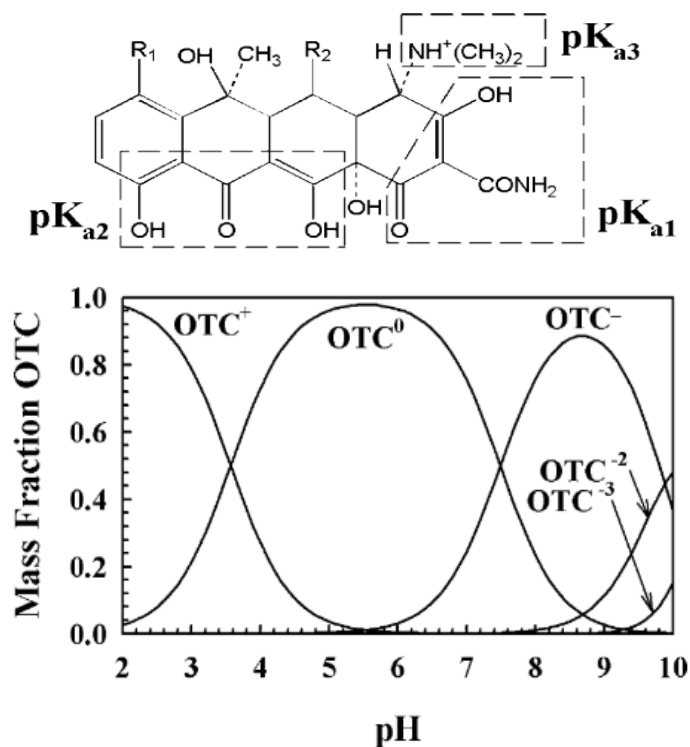


Figura 43. Especiación química de la oxitetraciclina (OTC). Todos los antibióticos de la familia de las tetraciclinas presentan la estructura de base común. Se resaltan los sitios de intercambio (pK_a) ambientalmente relevantes. En la figura inferior, se observa el diagrama de especiación calculado para OTC en función del pH. Estas especies modificarán la adsorción de OTC. Tomado de Figueroa et al., 2004.

En resumen, se pudo demostrar que los parámetros como el pH, la CE y la DQO de las aguas naturales estudiadas aumentan la movilidad de los antibióticos ionóforos en la fracción soluble (Cha et al., 2005). En este sentido las características fisicoquímicas de las aguas naturales son un factor importante que determina la dinámica de estos compuestos en la fracción soluble.

5.3.4.4. Comparación con otros contaminantes agrícolas

En ausencia de informes ambientales de antibióticos ionóforos en los ecosistemas argentinos, se realizó una comparación con otros contaminantes agrícolas investigados en Argentina como plaguicidas. Los rangos de concentración obtenidos en el presente estudio para los antibióticos ionóforos en aguas superficiales (2-4670 ng/L) mostraron el mismo orden de magnitud que compuestos como Clorpirifós, Cipermetrina o Plaguicidas Organoclorados (10-6620 ng/L) en cuerpos de agua de la misma región que drenan materiales hacia el Río Paraná (Etchegoyen et al., 2017). Esto enfatiza la relevancia del ingreso ambiental para estos contaminantes emergentes, alcanzando niveles de concentración equivalentes en los medios acuáticos respecto a otros contaminantes ampliamente estudiados. Sin embargo, no se encuentra información a nivel regional de los contaminantes asociados a la producción pecuaria siendo el presente trabajo el primero que los identifica y cuantifica en Argentina

5.3.5. Los humedales como sistemas de depuración natural.

Después de cuatro campañas de monitoreo estacional en 5 lugares diferentes ($n = 20$), no se detectaron ionóforos en las muestras de HU, con la excepción de solo dos muestras ambas por debajo de los límites de cuantificación: una en la campaña de otoño ($[MON] \leq LCM$) en el noroeste de la llanura de inundación, y otra en la campaña de invierno ($[OTC] \leq LCM$) en zona de desembocadura del río Guauguay. En contraste con el comportamiento observado para toda la campaña de la subcuenca del Guauguay (Sección 5.3.3.3), no se registró ningún patrón estacional con los cambios estacionales. Aunque las concentraciones medidas de antibióticos veterinarios en cursos caudalosos de la cuenca PAR y GUA, especialmente aquellos valores

registrados en la fracción soluble, implican cargas mensurables de transferencia de antibióticos al Delta (Figura 41) con pulsos variables para algunas moléculas y con bastante frecuencia para MON. Es notable la capacidad (al menos, actual) del sistema para diluir y reciclar estos contaminantes orgánicos, en base a una variedad de procesos biogeoquímicos y ecosistémicos (Dordio et al., 2008; Verhoeven et al., 2006). La capacidad de los humedales para degradar los productos farmacéuticos veterinarios y específicamente los antibióticos ionóforos se ha estudiado a microescala en humedales aplicados para el tratamiento de aguas residuales agrícolas, con eficiencias de eliminación en un rango de 20 a 50% para ionóforos, y con valores superiores al 70% para tetraciclinas (Almeida et al., 2013; Hussain et al., 2012; Hussain y Prasher, 2011; Y. Li et al., 2014). Dadas las concentraciones de antibióticos informadas en la fase acuosa en el presente estudio, así como la baja eficiencia de eliminación en humedales a escala piloto, es importante reconocer que la capacidad de purificación del Delta sea posiblemente finita en las condiciones actuales, e incluso el escenario empeore si MON, sin marco regulatorio actual, sigue el camino de otros contaminantes hacia convertirse en pseudo-persistente. Se refuerza entonces la necesidad de generar legislación apropiada, que permita regular la emisión de estos contaminantes y sumarlos a sistemas de vigilancia, a fines de preservar la calidad de ecosistemas tan importantes para la biodiversidad como son los humedales.

5.3.6. Degradación de antibióticos

Como parte del trabajo experimental se evaluaron las estabilidades en condiciones naturales y en fotoreactores de los compuestos estudiados, a fin de generar información complementaria para la interpretación de los resultados ambientales en cuerpos de agua.

Además de los presentados anteriormente, existen múltiples factores que pueden condicionar no solo la distribución de los antibióticos en los sistemas naturales, sino su estabilidad en los medios acuáticos. Los antibióticos ionóforos son susceptibles a hidrólisis a pH ácidos, con vidas medias de 13 y 0,6 días para MON y SAL respectivamente a pH = 4 (Bohn et al., 2013). Mientras que LAS resulta más estable para la hidrólisis respecto a los otros de la familia, siendo más sensible a reacciones fotoquímicas por la funcionalidad molecular que lo constituye. Se calculó una vida media menor a una hora para LAS debido a fotólisis a longitudes de onda ambientales, mientras que no se observaron decaimientos significativos para MON ya que no absorben radiación en el espectro estudiado (Bohn et al., 2013). Vale señalar que SAL puede ser degradado mediante luz solar o UV, y condiciones ambientales como la materia orgánica y los nitratos presentes en el agua pueden favorecer la fotólisis. Para tetraciclinas, la composición de la matriz acuosa y la radiación tienen efecto significativo sobre su estabilidad, observándose vidas medias de 2 días para TTC en un agua superficial expuesta a luz natural (Verma et al., 2007), mientras que factores como T, pH y $[Ca^{+2}]$ afectan significativamente la hidrólisis y fotólisis de OTC (Xuan et al., 2010).

5.3.6.1. Ensayo de estabilidad

A fines de evaluar la posible degradación de los antibióticos mediante hidrólisis y fotólisis en las condiciones de este trabajo, se realizaron ensayos de estabilidad de LAS, MON, SAL, TTC, OTC y CTC conforme a los lineamientos propuestos Bohn et al. (2013). Se evaluó el efecto de hidrólisis y fotólisis exponiendo soluciones de 1000 µg/L de cada fármaco a 3 condiciones de pH (3, 7 y 9) en recipientes tapados de polipropileno. Cada tratamiento se realizó en condiciones de luz natural, colocando los tubos en un espacio abierto durante 30 días. Las

temperaturas medias fueron de $27 \pm 4^{\circ}\text{C}$ (día) y $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ de noche durante ese período. Para separar el efecto de hidrólisis, otra fracción de tubos se cubrieron de la radiación en una cámara oscura, expuestos a las mismas temperaturas ambientales. En todos los tratamientos se aplicaron puntos por triplicado y como control, una réplica de cada tubo se preservó en frío hasta el momento del análisis para considerar efectos de hidrólisis en la conservación.

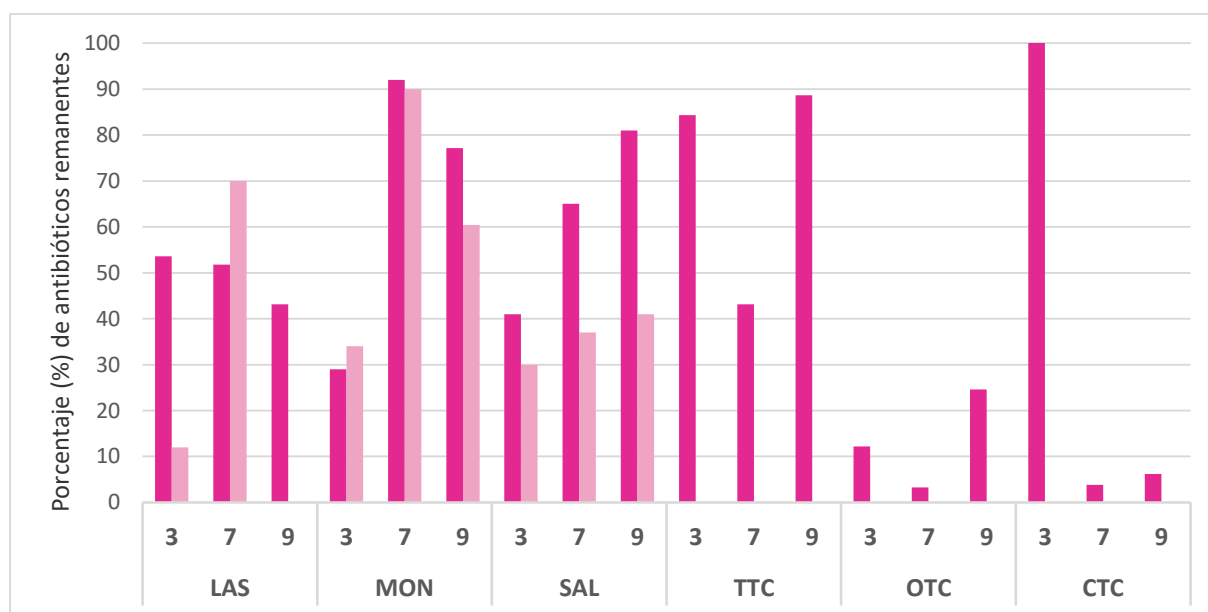


Figura 44. Valores medios de recuperación de antibióticos post-exposición a 30 días en distintas condiciones de luz y pH. En el eje vertical se pueden ver los porcentajes de individuales remanentes en el tubo expuesto.

Al final del ensayo, no se detectaron tetraciclinas en los tubos expuestos a la luz en ninguno de los tratamientos de pH (Figura 44). En las condiciones estudiadas, TTC presentó una mayor degradación a la reportada por Verma et al. (2007), quien determinó vidas medias de 32 y 83 días en agua destilada en condiciones de luz y oscuridad respectivamente. La fotólisis es un mecanismo principal propuesto en la degradación de las tetraciclinas, con vidas medias rápidas del orden de las pocas horas hasta 2-3 días en aguas naturales (Niu et al., 2013; Sørensen et al., 2004; Verma et al., 2007; Xuan et al., 2010). La hidrólisis también afecta a estos compuestos, observándose recuperaciones menores al 30% para OTC y CTC (excepto a pH =

3 para CTC). Para TTC y OTC se observó un mayor efecto de hidrólisis a pH neutro, siendo susceptibles entonces a los pH propios de cuerpos de agua superficial como los estudiados en este trabajo. La influencia de estos mecanismos de degradación y labilidad de las moléculas de esta familia química en las condiciones de contorno (según los ensayos de estabilidad realizados) pueden ser factores determinantes en las bajas frecuencias de detección observadas en aguas de la región pampeana.

Para el caso de los ionóforos, LAS se muestra más susceptible a la fotólisis a pH 3 y 9 como reporta Bohn et al. (2013). Se observa un menor efecto significativo de este mecanismo a pH neutro para LAS y MON. El efecto de la fotólisis no es significativo para MON, siendo la hidrólisis el mecanismo principal de degradación, especialmente a pH ácido. Este efecto también se manifiesta para SAL, sin embargo, en este caso la fotólisis es relevante, reflejada a través de la diferencia entre los ensayos luz/oscuridad, simultáneamente un aumento de pH potencia el efecto de la fotólisis (Sun, 2014). La baja absorción de radiación de MON y SAL resulta en mayor estabilidad respecto a la fotólisis, sin embargo factores como el pH pueden alterar y favorecer este mecanismo, además de promover pérdidas significativas por hidrólisis (Bohn et al., 2013; Hansen et al., 2009b; Sun et al., 2014).

5.3.6.2. Degradación de monensina por procesos Fenton

Dada la estabilidad a la fotólisis, se estudió el comportamiento de MON al aplicar un proceso de fotodegradación tipo foto-Fenton. El objetivo del ensayo consistió en evaluar la posibilidad de degradación y su cinética en las condiciones de un sistema clásico de eliminación de contaminantes ampliamente estudiado como los procesos Fenton (Homem y Santos, 2011).

Este tipo de caracterizaciones resulta de interés no solo en la interpretación de resultados sino también en la factibilidad de su uso como técnica para remediar aguas contaminadas tal como lo descrito en la Sección 1.4.1. El trabajo se llevó a cabo en el Instituto Tecnológico de Buenos Aires (ITBA), en colaboración con el Departamento de Ingeniería Química dirigido por Jorge Stripeikis. El ensayo siguió los protocolos establecidos por Serra-Clusellas et al. (2018), en cuanto al sistema y los parámetros del ensayo, consistentes en un reactor de vidrio (Pirex®) de 500 mL. Debido a la baja solubilidad de MON en agua, se vehiculizó con MeOH, el cual modificó la cantidad de peróxido de hidrógeno requerido. Las condiciones estudiadas fueron: $[MON] = 1 \text{ mg/L}$; $[H_2O_2] = 5 \text{ mg/L}$; $[Fe^{+2}] = 5 \text{ mg/L}$; $pH = 2,8$. El ensayo tuvo una duración de 3hs, colectando muestras desde el inicio, a 10 minutos en intervalos de, 30 minutos hasta los 120 minutos y una muestra final a los 180 minutos. El reactor termostatzado a 25°C (colocado en oscuridad) se mantuvo en agitación todo el tiempo del ensayo, y la solución se hizo recircular, mediante una bomba peristáltica marca MasterflexR®, por un tubo de vidrio Pirex® -colocado sobre una superficie reflectiva adaptada de un dispositivo "SolarMate®". Las muestras del reactor fueron tratadas con Na_2SO_3 y aireación para finalizar la reacción y se mantuvo en frío hasta el momento del análisis instrumental por LC-MS según lo descrito en la Sección 3.5. y Sección 3.6.

Las concentraciones de MON analizadas se muestran en la Figura 45 a continuación. Frente al sistema de degradación de Fenton y por seguimiento de la concentración del compuesto en el medio acuoso de reacción, se observa un rápido decaimiento de la concentración de MON, a los 10 minutos, presentando concentraciones variables entre 2 y $21 \mu\text{g/L}$ en los tiempos siguientes, siendo ese tiempo el responsable de la degradación de alrededor del 98% del compuesto en ese corto tiempo. La efectividad del ensayo indica una potencial aplicación

de este tipo de herramientas para el tratamiento de efluentes originados en la producción animal. Si bien los efluentes presentan características mucho más complejas que las ensayadas en este trabajo, la combinación de estrategias de tratamientos que favorezcan la reducción de la carga orgánica puede ser una herramienta útil para disminuir la carga de antibióticos residual de estos sistemas y una herramienta aplicable para aguas subterráneas. Por ejemplo, pueden combinarse sistemas de biodiscos o biodigestores seguidos de tratamientos de fotodegradación sobre el efluente ya clarificado (Homem y Santos, 2011), o sistemas de humedales que además aportan a la disminución de la carga de antibióticos (Hussain y Prasher, 2011).

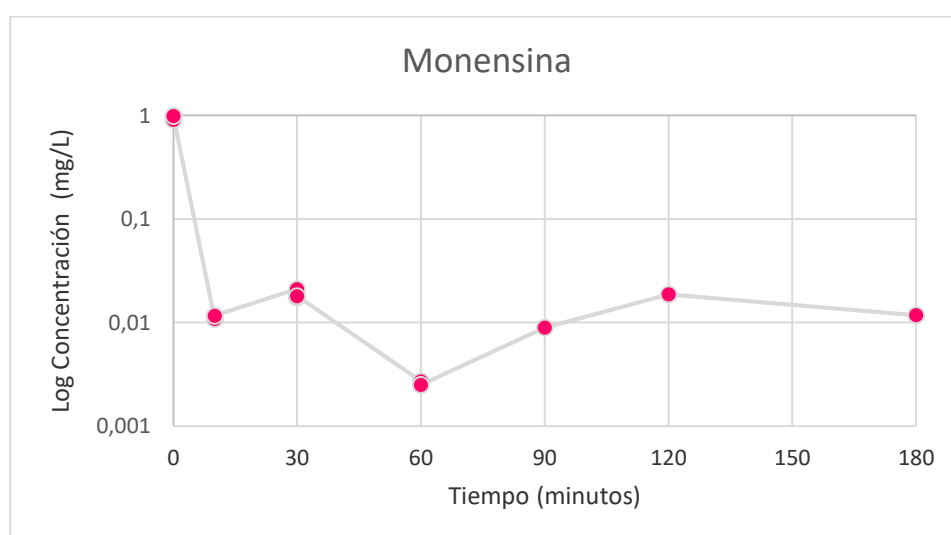


Figura 45. Degradación de MON.

5.4.Efectos en la salud ambiental

Tal como se discutió en la Sección 1.3 del presente trabajo, los efectos estudiados para antibióticos ionóforos y tetraciclinas suelen encontrarse por debajo de las dosis causantes de efectos agudos en organismos acuáticos, rondando niveles de bajos mg/L (Hansen et al., 2009a). Como ocurre con los contaminantes emergentes en términos generales, existen

pocos estudios dedicados a la exposición crónica de los mismos y sus potenciales efectos en tales condiciones. Esta carencia de información limita los análisis acerca del riesgo actual que presentan concentraciones inferiores como las obtenidas en este estudio, que van desde unos pocos ng/L hasta máximos de 4670 ng/L en fracción soluble, o 14000 ng/g en sedimentos de fondo, los cuales podrían presentar riesgo ambiental para organismos acuáticos y bentónicos, de acuerdo a los coeficientes calculados por Hansen et al. (2009). Las algas y *Daphnias* presentan mayor susceptibilidad que los peces a efectos de ionóforos. El estudio de este tipo de organismos a corto plazo puede subestimar el verdadero riesgo, por lo que se sugieren realizar diseños experimentales que contemplen el mediano-largo efecto para poder estimar mejores coeficientes de riesgo (N. Li et al., 2014). Además, se desconocen los efectos que pueden darse en situaciones de co-ocurrencia (mezclas) de compuestos. Se ha reportado que los ionóforos tienen un rol sinérgico, potenciando el efecto tóxico de tilosina (Basaraba et al. 1999). El suelo también debe incorporarse como objeto de estudio en los sistemas de monitoreo de estos compuestos, dado que se han reportado efectos causados por MON en lombrices y comunidades de microorganismos (Hilaire et al., 2020; Menezes-Oliveira et al., 2018).

Además de los efectos directos sobre los organismos (agudos y crónicos), es importante el estudio de genes de resistencia a antibióticos, para evaluar el efecto de estos compuestos sobre la microbiota local. Se conoce que los sólidos en suspensión enriquecen los genes de resistencia, movilizandolos los mismos incluso hasta los sedimentos de fondo y afectando así a las comunidades bentónicas (Barrón et al., 2018). Las lagunas de tratamientos pueden afectar también a las aguas subterráneas – tal como se comprobó en este estudio, la movilidad vertical puede movilizar antibióticos hasta más de 4 metros (Chee-Sanford et al., 2001). Si

bien a las concentraciones actuales de antibióticos no se observa riesgo directo de exposición a bacterias que expresen resistencia, los ambientes receptores de cargas de compuestos veterinarios pueden transformarse en sumideros de estos microorganismos, generando problemas a largo plazo sobre la salud humana (Watkinson y Costanzo, 2017).

Bibliografía

- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Capparelli, A.L., Marino, D.J.G., 2019. Behavior of ionophore antibiotics in aquatic environments in Argentina: The distribution on different scales in water courses and the role of wetlands in depuration. *Environ. Int.* 133, 105144.
- Antweiler, R.C., Taylor, H.E., 2008. Evaluation of statistical treatments of left-censored environmental data using coincident uncensored data sets: I. Summary statistics. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3732-3738.
- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation, Washington DC.
- Arikan, O.A., Mulbry, W., Rice, C., 2009. Management of antibiotic residues from agricultural sources: Use of composting to reduce chlortetracycline residues in beef manure from treated animals. *J. Hazard. Mater.* 164, 483-489.
- Arikan, O.A., Mulbry, W., Rice, C., 2016. The effect of composting on the persistence of four ionophores in dairy manure and poultry litter. *Waste Manag.* 54, 110-117.
- Arzubi, A., Vidal, R., y Moares, J., 2015. Boletín Trimestral Bovino N°14. 75 p. Subsecretaría de Ganadería. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Buenos Aires, Argentina.
- Awad, Y.M., Kim, S.C., Abd El-Azeem, S.A.M., Kim, K.H., Kim, K.R., Kim, K., Jeon, C., Lee, S.S., Ok, Y.S., 2014. Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. *Environ. Earth Sci.* 71, 1433-1440.
- Bak, S., Björklund, E., 2014. Occurrence of Ionophores in the Danish environment Antibiotics.
- Barrón, M.D. la C., Merlin, C., Guilloteau, H., Montargès-Pelletier, E., Bellanger, X., 2018. Suspended materials in river waters differentially enrich class 1 integron- and IncP-1

plasmid-carrying bacteria in sediments. *Front. Microbiol.*
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01443>

Basile, P.A., 2018. Transporte de sedimentos y morfodinamica de rios aluviales, *Biomass Chem Eng.*

Ben, W., Pan, X., Qiang, Z., 2013. Occurrence and partition of antibiotics in the liquid and solid phases of swine wastewater from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China. *Environ. Sci. Process. Impacts* 15, 870-5.

Ben, W., Qiang, Z., Adams, C., Zhang, H., Chen, L., 2008. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1202, 173-180.

Biswas, S., McGrath, J.M., Sapkota, A., 2012. Quantification of ionophores in aged poultry litter using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 47, 959–966.

Bohn, P., Bak, S.A., Björklund, E., Krogh, K.A., Hansen, M., 2013. Abiotic degradation of antibiotic ionophores. *Environ. Pollut.* 182, 177-183.

Boreen, A.L., Arnold, W.A., McNeill, K., 2003. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. *Aquat. Sci.*

Buenos Aires, Argentina.

Busso Silva, A., y Santa Cruz, J., 2005. Distribución de elementos traza en las aguas subterráneas del Partido de Escobar, Buenos Aires, Argentina. *Ecología austral*, 15, 31-47.

Castillo, S., Durante, M., Gange, J.M., 2016. Watershed analysis as poultry litter receptor. *Doc. INTA.*

- Cha, J.M., Yang, S., Carlson, K., 2005. Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography with ion trap tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1065, 187-198.
- Chee-Sanford, J.C., Aminov, R.I., Krapac, I.J., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I., 2001. Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Clarke, J.U., 1998. Evaluation of censored data methods to allow statistical comparisons among very small samples with below detection limit observations. *Environ. Sci. Technol.*
- Couperus, N.P., Pagsuyoin, S.A., Bragg, L.M., Servos, M.R., 2016. Occurrence, distribution, and sources of antimicrobials in a mixed-use watershed. *Sci. Total Environ.* 541, 1581-1591.
- Dirección de Hidráulica de Entre Ríos, 2018. (29 de octubre de 2018). Recuperado de <https://www.hidraulica.gob.ar/>.
- Dordio, A., Carvalho, A.J.P., Pinto, A.P., 2008. Wetlands: water “living filters”? *Wetl. Ecol. Conserv. Restor.* 15–71.
- Doydora, S.A., Sun, P., Cabrera, M., Mantripragada, N., Rema, J., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., Thompson, A., 2017. Long-term broiler litter amendments can alter the soil’s capacity to sorb monensin. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 13466-13473. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8727-9>
- Engler, P., Rodriguez, M., Cancio, R., Handloser, M., Vera, L.M., 2008. Zonas AgroEconómicas Homogéneas Entre Ríos, Estudios socioeconómicos de la sustentabilidad de los sistemas de producción y recursos naturales.
- Etchegoyen, M., Ronco, A., Almada, P., Abelando, M., Marino, D., 2017. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environ. Monit. Assess.* 189.

- Fairbairn, D.J., Karpuzcu, M.E., Arnold, W.A., Barber, B.L., Kaufenberg, E.F., Koskinen, W.C., Novak, P.J., Rice, P.J., Swackhamer, D.L., 2015. Sediment – water distribution of contaminants of emerging concern in a mixed use watershed. *Sci. Total Environ.* 505, 896-904.
- Figuerola, R.A., Leonard, A., Mackay, A.A., 2004. Modeling Tetracycline Antibiotic Sorption to Clays. *Environ. Sci. Technol.* 38, 476-483. <https://doi.org/10.1021/es0342087>
- Forrest, F., Lorenz, K., Thompson, T., Keenlside, J., Kendall, J., Charest, J., 2011. A scoping study of livestock antimicrobials in agricultural streams of Alberta. *Can. Water Resour. J.* 36, 1–16.
- Furtula, V., Huang, L., Chambers, P.A., 2009. Determination of veterinary pharmaceuticals in poultry litter and soil by methanol extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 44, 717-723.
- Gange, J.M., Almada, N., Bernigaud, I.C., 2017. Residuos de la agroindustria: el caso de la cama de pollo en Entre Ríos, en: X Jornadas Interdisciplinarias de Estudios Agrarios y Agroindustriales Argentinos y Latinoamericanos. X Jornadas Interdisciplinarias de Estudios Agrarios y Agroindustriales Argentinos y Latinoamericanos Buenos, Buenos Aires, pp. 1-19.
- Hansen, M., Krogh, K.A., Björklund, E., Halling-Sørensen, B., Brandt, A., 2009. Environmental risk assessment of ionophores. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 534-542. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.02.015>
- Hansen, M., Krogh, K.A., Brandt, A., Christensen, J.H., Halling-Sørensen, B., 2009. Fate and antibacterial potency of anticoccidial drugs and their main abiotic degradation products. *Environ. Pollut.* 157, 474-480.
- Heiri, O., Lotter, A.F., Lemcke, G., 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: Reproducibility and comparability of results. *J.*

Paleolimnol.

Helsel, D.R., 2012. Statistics for Censored Environmental Data Using Minitab and R, 2nd ed. Wiley (344 pp).

Herzer, H., Caputo G., Celis A., 2004. Gestión de riesgos de desastre ENSO en América Latina. Propuesta de Consolidación de un Red Regional de Investigación Comparativa, Información y Capacitación desde una Perspectiva Social.

Homem, V., Santos, L., 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. J. Environ. Manage.

Hussain, S.A., Prasher, S.O., 2011. Understanding the sorption of ionophoric pharmaceuticals in a treatment wetland. Wetlands 31, 563-571.

Hussain, S.A., Prasher, S.O., Patel, R.M., 2012. Removal of ionophoric antibiotics in free water surface constructed wetlands. Ecol. Eng. 41, 13-21.

Iglesias, A., Nebot, C., Miranda, J.M., Vázquez, B.I., Cepeda, A., 2012. Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 3235-3249.

Jaimes-correa, J.C., Snow, D.D., Bartelt-hunt, S.L., 2015. Seasonal occurrence of antibiotics and a beta agonist in an agriculturally-intensive watershed. Environ. Pollut. 205, 87–96.

Kandus, P., Morandeira, N., Schivo, F., 2010. Bienes y Servicios Ecosistémicos de los

Kennedy, I.R., Ahmad, N., Beasley, H., Chapman, J., Hobbs, J., Simpson, B., Woods, N., 1998. Quality Assurance in Pesticide Sampling and Analysis, LWRRDC, Occasional Paper N°14/98.

Kim, S.C., Carlson, K., 2006. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a

- mixed-landscape watershed. *Water Res.* 40, 2549-2560.
- Kim, S.C., Carlson, K., 2007a. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environ. Sci. Technol.* 41, 50-57.
- Kim, S.C., Carlson, K., 2007b. Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1301-1315.
- Kim, S.C., Yang, J.E., Ok, Y.S., Carlson, K., 2010. Dissolved and colloidal fraction transport of antibiotics in soil under biotic and abiotic conditions. *Water Qual. Res. J. Canada* 45, 275-285.
- Li, Y., Zhu, G., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Sci. Total Environ.* 468-469, 908-932.
- Lee, Lopaka, 2017. NADA: nondetects and data analysis for environmental data. R package version 1.6-1.
- Li, N., Zhang, X., Wu, W., Zhao, X., 2014. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of antibiotics in the reservoirs in North China. *Chemosphere* 111, 327-335. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.129>
- Lindsey, M.E., Meyer, T.M., Thurman, E.M., 2001. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 73, 4640-4646.
- Lissemore, L., Hao, C., Yang, P., Sibley, P.K., Mabury, S., Solomon, K.R., 2006. An exposure assessment for selected pharmaceuticals within a watershed in Southern Ontario. *Chemosphere* 64, 717-729.
- Mac Loughlin, T.M., Peluso, M.L., Aparicio, V.C., Marino, D.J.G., 2020. Contribution of soluble and particulate-matter fractions to the total glyphosate and AMPA load in water bodies associated with horticulture. *Sci. Total Environ.* 703.

- Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I., Chee-Sanford, J., Maxwell, S., Aminov, R.I., 2006. Tetracycline residues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities. *Anim. Biotechnol.* 17, 157-76.
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O., 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environ. Pollut.* 148, 570-579.
- Mesa, L., Mayora, G., Saigo, M., Giri, F., 2015. Nutrient dynamics in wetlands of the middle Paraná River subjected to rotational cattle management. *Wetlands* 35, 1117–1125.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, 2019. (20 de marzo de 2019). Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/agricultura-ganaderia-y-pesca>.
- Ministerio del Interior de la Nación, 2019. (5 de mayo de 2019). Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/interior>.
- Navarro, M., Barbieri, S.C., Alonso, L.L., Marino, D.J., 2019. Análisis de antibióticos políéteres ionóforos (API) en suelos hortícolas con aplicación de enmiendas orgánicas. En actas de Simposio “XIV Simpósio Latino-Americano de Química Analítica Ambiental”. Bento Gonçalves – Brasil
- Niu, J., Li, Y., Wang, W., 2013. Light-source-dependent role of nitrate and humic acid in tetracycline photolysis: Kinetics and mechanism. *Chemosphere* 92, 1423-1429.
- Ok, Y.S., Kim, S.C., Kim, K.R., Lee, S.S., Moon, D.H., Lim, K.J., Sung, J.K., Hur, S.O., Yang, J.E., 2011. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea. *Environ. Monit. Assess.* 174, 693-701.
- Pan, X., Qiang, Z., Ben, W., Chen, M., 2011. Simultaneous determination of three classes of antibiotics in the suspended solids of swine wastewater by ultrasonic extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Environ. Sci.* 23, 1729-1737.

- Primost, J.E., Marino, D.J.G., Aparicio, V.C., Costa, J.L., Carriquiriborde, P., 2017. Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ. Pollut.* 229, 771-779.
- R Core Team, 2018. A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Reis, I., Ribeiro, I.L., Basto, M.C.P., Carvalho, P.N., Almeida, C.M.R., Mucha, A.P., Pereira, A.C., Fernandes, J.P., 2015. Microbial community dynamics associated with veterinary antibiotics removal in constructed wetlands microcosms. *Bioresour. Technol.* 182, 26-33.
- Ronco, A.E., Marino, D.J.G., Abelando, M., Almada, P., Apartin, C.D., 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin : glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ. Monit. Assess.*
- Sandoz, M.A., Wooten, K.J., Clendening, S.L., Hensley, L.L., Smith, L.R., Smith, P.N., 2018. Transport mechanisms for veterinary pharmaceuticals from beef cattle feedyards to wetlands: Is aerial deposition a contributing source? *Agric. Ecosyst. Environ.* 252, 14-21.
- Sandoz, M.A., Wooten, K.J., Clendening, S.L., Hensley, L.L., Smith, L.R., Smith, P.N., 2018. Transport mechanisms for veterinary pharmaceuticals from beef cattle feedyards to wetlands: is aerial deposition a contributing source? *Agric. Ecosyst. Environ.* 252, 14–21.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725-759.
- Sassman, S.A., Lee, L.S., 2007. Sorption and degradation in soils of veterinary ionophore antibiotics: Monensin and Lasalocid. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1614-1621.
- Schell, H., Cumini, M.L., Cislighi, A.M., y Bujía, D., 2010. Información de la actividad avícola

de Entre Ríos, período enero-mayo 2010.

Secretaría de Infraestructura y política Hídrica de la Nación, 2018. (15 de octubre de 2018)

Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/obras-publicas/hidricas/base-de-datos-hidrologica-integrada>.

SENASA, 2018. (25 de octubre de 2018). Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/senasa>.

Serra Clusellas, A., De Angelis, L., Lin, C.H., Vo, P., Bayati, M., et al. Abatement of 2,4-D by H₂O₂ solar photolysis and solar photo-Fenton-like process with minute Fe(III) concentrations. *Water Research*; 144; 11-2018; 572-580.

Søeborg, T., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B., 2004. Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water. *Chemosphere* 57, 1515-1524.

Song, W., Huang, M., Rumbeiha, W., Li, H., 2007. Determination of amprolium, carbadox, monensin, and tylosin in surface water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 1944-1950.

Stanev, V., Vargas, R., Quiroz, M., Vancraeynest, D., 2015. Coccidiosis prevention strategies and practices in the Americas. In: 20th European Symposium on Poultry Nutrition, (p. P-263).

Sun, P., 2014. Transformation of Veterinary Antibiotics under conditions related to Water-Soil-Litter Systems.

Sun, P., Barmaz, D., Cabrera, M.L., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., 2013. Detection and quantification of ionophore antibiotics in runoff, soil and poultry litter. *J. Chromatogr. A* 1312, 10-17.

Sun, P., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., 2014. Photodegradation of veterinary ionophore

- antibiotics under UV and solar irradiation. *Environ. Sci. Technol.* 48, 13188-13196.
- Sun, P., Pavlostathis, S.G., Huang, C.H., 2016. Estimation of environmentally relevant chemical properties of veterinary ionophore antibiotics. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 18353-18361.
- Tao, R., Ying, G.G., Su, H.C., Zhou, H.W., Sidhu, J.P.S., 2010. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China. *Environ. Pollut.*
- Tolls, J., 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environmental Science and Technology*, 35, 3397–3406.
- Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K., 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090-1097.
- Verhoeven, J.T.A., Arheimer, B., Yin, C., Hefting, M.M., 2006. Regional and global concerns over wetlands and water quality. *Trends Ecol. Evol.* 21, 96–103.
- Verma, B., Headley, J. V, Robarts, R.D., 2007. Behaviour and fate of tetracycline in river and wetland waters on the Canadian Northern Great Plains. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 42, 109-117.
- Voice, T.C., Weber, W.J., 1983. Sorption of hydrophobic compounds by sediments, soils and suspended solids-I. Theory and background. *Water Res.*
- Wang, S. y Wang, H., 2015. Adsorption behavior of antibiotic in soil environment: a critical review. *Front. Environ. Sci. Eng.*
- Watanabe, N., Harter, T.H., Bergamaschi, B.A., 2008. Environmental occurrence and shallow ground water detection of the antibiotic monensin from dairy farms. *J Env. Qual* 37, S78-85.

Water Framework Directive (WFD), the so-called QA/QC Directive (Council of European Communities 2009).

Watkinson, A.J., Costanzo, S.D., 2017. Antimicrobials and Antimicrobial Resistant Bacteria in Australia. *Antimicrob. Resist. Wastewater Treat. Process.* 109-127. <https://doi.org/10.1002/9781119192428.ch7>

Xu, J., Zhang, Y., Zhou, C., Guo, C., Wang, D., Du, P., Luo, Y., Wan, J., Meng, W., 2014. Distribution, sources and composition of antibiotics in sediment, overlying water and pore water from Taihu Lake, China. *Sci. Total Environ.* 497-498, 267-273.

Xuan, R., Arisi, L., Wang, Q., Yates, S.R., Biswas, K.C., 2010. Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes.*

Yang, S., Cha, J., Carlson, K., 2004. Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*

Yao, H., Sun, P., Minakata, D., Crittenden, J.C., Huang, C.H., 2013. Kinetics and modeling of degradation of ionophore antibiotics by UV and UV/H₂O₂. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4581-4589.

Yoshida, N., Castro, M., du Mortier, C., Cirelli, A.F., 2007. Environmental behavior of antibiotic monensin: preliminary studies in Argentina. *Environ. Chem. Lett.* 5, 157–160.

Yoshida, N., Castro, M.J.L., Cirelli, A.F., 2010. Degradation of monensin on soils: Influence of organic matter and water content. *Chem. Ecol.*

Zhang, Y., Zhang, C., Parker, D.B., Snow, D.D., Zhou, Z., Li, X., 2013. Occurrence of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in beef cattle storage ponds and swine treatment lagoons. *Sci. Total Environ.* 463-464, 631-638.

Capítulo 6 – Conclusiones



6. Conclusiones

6.1. Consideraciones previas

En función de las investigaciones realizadas en el plan de doctorado, respecto a los antibióticos usados en los sistemas pecuarios, tanto en la producción de carnes para consumo como producciones relacionadas, por ejemplo, huevos, donde:

- se exploraron y validaron métodos en laboratorio para su análisis químico en distintas matrices, se realizaron monitoreos espaciales y temporales de cuerpos de agua superficial y subterránea,
- se desarrollaron ensayos a campo para evaluar el uso de enmiendas orgánicas provenientes de establecimientos avícolas y su incidencia sobre la escorrentía superficial,
- se estudiaron procesos de fotodegradación y se evaluó el rol del humedal del Delta del Paraná, en la zona de Entre Ríos como sistema purificador

Los resultados incluidos y discutidos en el presente manuscrito, constituyen el primer aporte a la temática de dinámica ambiental de antibióticos de uso veterinario, identificados y cuantificados en ambientes de Argentina y de la región. Este abordaje integral ha permitido, luego del análisis de datos de manera integral y territorial, elaborar las siguientes conclusiones finales del estudio.

6.2. Conclusiones finales

Se lograron generar metodologías de extracción, detección y cuantificación para el análisis químico ambiental de antibióticos veterinarios (ionóforos y tetraciclinas) en aguas superficiales y subterráneas, sólidos en suspensión, suelos y sedimentos de fondo de la región pampeana. La espectrometría de masas es una herramienta robusta, específica y selectiva para el análisis de fármacos veterinarios en muestras ambientales. Como aspecto destacable la formación de aductos entre ionóforos y cationes como sodio, fue crítico en la detección de estos compuestos, desde los pasos vinculados a extracción de las muestras, hasta la ionización y formación de fragmentos característicos en los analizadores de masas. Los sistemas UHPLC-MS/MS presentan ventajas frente a sistemas HPLC-MS. Particularmente la detección por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite alcanzar límites de detección de más de un orden de magnitud inferiores a los observados en MS simple, a partir del trabajo con el segundo cuadrupolo en analizando transiciones específicas para los iones precursores, ello permitió alcanzar límites de detección de hasta 0,02 µg/L, en concordancia con los métodos más sensibles publicados a nivel internacional. El sistema UHPLC-MS/MS permite un rango lineal de trabajo ampliado, con buena repetibilidad de las inyecciones, acordes a normativas europeas para en análisis de contaminantes trazas. La cromatografía UHPLC es más rápida, disminuyendo los tiempos de análisis y uso de solventes orgánicos y puede considerarse como una herramienta de trabajo amigable con el ambiente.

Parte de la dosis de fármacos veterinarios incorporada a los animales a través de la alimentación con fines profilácticos o de promoción de crecimiento, es excretada sin metabolizar, y colectada en camas de pollo (en el caso de las aves). Estas camas de pollo presentan concentraciones de ionóforos cuantificables, y que, al ser aplicadas como

enmiendas orgánicas sobre los suelos con fines agrícolas, presentan movilidad de estos compuestos por medio de escorrentía superficial o percolación hacia capas profundas de suelo. Un aumento en la concentración de ionóforos en la cama de pollo, se traduce en aumento en la concentración de estos contaminantes emergentes en la escorrentía. Aplicando lluvias a las 24 y 72 hs posterior a la aplicación de la cama no se observaron diferencias significativas en la movilidad por escorrentía superficial como efecto de la estabilización, sin embargo, se observa mayor movilidad vertical. Esta movilidad vertical es responsable de la detección de ionóforos en aguas subterráneas tal como se observó sobre agua freática a 4 metros de profundidad, en la cual se detectaron concentraciones de ionóforos incluso 2 años después del cierre del establecimiento.

Las actividades de producción animal dependientes de antibióticos veterinarios, contaminan los cuerpos de agua de la región pampeana, donde se detectó presencia de antibióticos ionóforos y/o tetraciclinas en el 58% de los cuerpos de agua estudiados, donde los ionóforos se detectan en mayor frecuencia que las tetraciclinas, siendo la monensina el antibiótico prevalente, tanto en la ocurrencia como en las concentraciones cuantificadas en todo el estudio en aguas.

La fracción soluble de la columna de agua presentó mayor frecuencia de detección respecto a las otras matrices estudiadas como sólidos en suspensión y sedimentos de fondo, sin embargo, las concentraciones cuantificadas en estos sólidos fueron significativamente superiores a las de la fracción soluble, como consecuencia de su naturaleza química

Las concentraciones registradas en los sólidos en suspensión para los casos cuantificables, alcanzaron el orden de los mg/kg.

Estos resultados permitieron estimar pseudo-coeficientes de reparto, indicando la afinidad de los ionóforos y oxitetraciclina hacia fases sólidas, siendo estos valores en términos de los sólidos en suspensión, más representativos de los coeficientes de reparto teóricos y bibliográficos que el caso de sedimentos. En futuros estudios, se propone realizar un mayor seguimiento temporal de estas matrices a fines de determinar si las altas concentraciones se deben a pulsos eventuales o son continuas en el tiempo, así como conducir ensayos de laboratorio para caracterizar los procesos de sorción/desorción sobre estos sistemas naturales. Así mismo dada la relevancia de estos contaminantes, que presentaron concentraciones en el mismo orden de magnitud que otros estudiados como los plaguicidas, y considerando los altos valores de constantes de reparto como K_{ow} que presentan, se recomienda estudiar su dinámica y procesos de bioconcentración y biomagnificación sobre organismos acuáticos y especialmente en peces para consumo humano.

Las concentraciones de monensina y salinomicina correlacionan con parámetros de calidad de aguas como el pH y la materia orgánica disuelta de manera esperada de acuerdo a los equilibrios de solubilidad condicionados por el pH del agua. La calidad de las aguas es un factor condicionante de la especiación química de estas moléculas y, por lo tanto, independientemente de la fuente, la presencia y la movilidad de los fármacos estudiados está condicionada por las características del medio receptor. Adicionalmente las características propias de las moléculas como hidrólisis y fotodegradación, que condicionan la vida media en el agua, afectan su estabilidad y por lo tanto variables como la frecuencia de detección y las concentraciones.

La detección y cuantificación de monensina, en agua y sedimentos de fondo, en un sistema hídrico caudaloso como el río Gualeguay, demuestra que el ingreso supera al efecto dilutorio, que resulta en un aporte de estos contaminantes hacia el Delta del Paraná.

Del tratamiento estadístico de resultados debe destacarse la importancia de aplicar herramientas de tratamiento de datos que se ajusten al conjunto de valores en análisis. Para la estimación de parámetros estadísticos (media, mediana) en poblaciones de datos con gran porcentaje de censura izquierda (elevados porcentajes de datos por debajo del límite de detección), se ha visto que aplicar metodologías de sustitución convencionales basadas en variantes basados en los límites de detección y cuantificación generalmente lleva a una estimación menos probable de los valores medios o medianas reales del conjuntos de datos, y pueden arrojar contextualizaciones equivocadas respecto de la comparación con niveles de referencia, así como fijar estadísticos representativos falsos para los sistemas en estudio. Los sistemas de imputación como Kaplan-Meier o la regresión de orden estadístico se presentan como alternativas válidas, siendo necesario estudiar caso a caso la elección del método más apropiado en términos del conjunto de datos.

En función de los resultados obtenidos para monensina, esta molécula debe monitorearse de manera especial ya que ha sido detectada frecuentemente en distintos cuerpos de agua y su eliminación ha sido posible solo con sistemas de laboratorio tipo foto-Fenton. En este aspecto deberían implementarse acciones urgentes para evitar que este xenobiótico se convierta en un contaminante pseudo-persistente en la región pampeana.

Los humedales poseen baja eficiencia en la eliminación de fármacos, especialmente ionóforos. A pesar de recibir aportes (como se registró en el río Gualeguay), la extensión de

un humedal como el Delta del Paraná permite diluir y recircular estos contaminantes mostrando aún la capacidad amortiguadora del sistema hídrico. Sin embargo, esa capacidad es finita y se han encontrado concentraciones detectables no cuantificables de monensina y oxitetraciclina en dos de los sitios monitoreados dentro del humedal y esa información debería tomarse como una alerta. Es imperativa la implementación de sistemas de vigilancia y monitoreo de estos compuestos, en conjunto a ensayos de laboratorio con organismos autóctonos que permitan establecer niveles guía de calidad para la protección de la biota acuática. Existe poca información sobre efectos subletales en organismos acuáticos que permitan contextualizar las concentraciones ambientales encontradas, pero algunos de los compuestos estudiados se han reportado como de riesgo para el ambiente. Además, la promoción de resistencia a antibióticos en la microbiota y sus consecuencias sobre la salud ambiental son una preocupación global que exige ser atendida de manera urgente, tal como lo disponen organismos y redes internacionales de las temáticas de resistencia microbiana.

Una técnica de tratamiento de agua como la fotodegradación mediante procesos Fenton fue capaz de eliminar cargas de antibióticos. Estos sistemas en conjunto a otros sistemas reductores de altas cargas orgánicas provenientes de los sitios de cría, como humedales artificiales o sistemas de biodiscos, pueden proponerse como alternativas para el tratamiento de efluentes de la producción. Sin embargo, la salida más eficiente para bajar la ocurrencia de estos antibióticos en los ecosistemas acuáticos es modificar el sistema productivo, recuperando prácticas ganaderas y avícolas que favorezcan la producción de alimentos sanos y de respeto animal como bases de una transformación sustentable y de salud pública.

Anexo I – Materiales y equipamiento utilizados

Reactivos y solventes

- Estándar de referencia de lasalocid, pureza 85%, marca Sigma Aldrich®
- Estándar de referencia de monensina, pureza 91%, marca Sigma Aldrich®
- Estándar de referencia de salinomicina, pureza 92,5%, marca Sigma Aldrich®
- Estándar de referencia de maduramicina, pureza 93,5%, marca Sigma Aldrich®
- Estándar de referencia de tetraciclina, pureza 99%, marca Sigma Aldrich®
- Estándar de referencia de oxitetraciclina, pureza 89%, marca Sigma Aldrich®
- Estándar de referencia de clortetraciclina, pureza 97,1%, marca Sigma Aldrich®
- Ácido cítrico, marca Anedra®, reactivo analítico
- Fosfato monoácido de sodio, marca Anedra®, calidad p.a.
- Sulfato de magnesio anhidro, marca Anedra®, calidad p.a.
- Cloruro de sodio, marca Biopack®, calidad p.a.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA sal disódica 2-hidrato), marca Biopack®, calidad p.a.
- Sulfito de sodio, marca Anedra®, calidad p.a.
- Ácido sulfúrico, marca Cicarelli®, 95-98%
- Peroxido de hidrógeno 30 % v/v, marca Anedra®
- Dicromato de potasio, marca Anedra®, calidad analítica
- Tartrato de antimonio y potasio, marca Anedra®, calidad analítica
- Amonio heptamolibdato tetrahidrato, marca Merck®, calidad p.a.
- Acetato de amonio, marca J.T.Baker®, calidad p.a.
- Ácido ascórbico, marca Sigma-Aldrich®, calidad p.a.

- Hexano normal, marca U.V.E[®], para análisis de residuos de plaguicidas (PARP)
- Metanol, marca J.T.Baker[®], para uso en cromatografía líquida y espectrofotometría
- Acetonitrilo, marca Tedia [®], para uso en cromatografía líquida y espectrofotometría
- Etanol, marca J.T.Baker[®], calidad p.a
- Agua calidad Nanopura

Materialles

- Cápsulas de porcelana de 100 ml
- Pipetas de vidrio graduadas de 1,00, 5,00 y 10,00 mL
- Probetas de vidrio de 50,0, 100,0, y 250,0 mL
- Matraces de vidrio de 10,00, 50,00, 100,00 y 500,00 mL
- Tubos de 15 y 50 mL tipo de polipropileno, tapa a rosca, marca DELTALAB
- Cartuchos SPE Oasis C18 HLB, marca Waters[®]
- Pipeta pasteur de vidrio neutro
- Micropipetas automáticas marca HTL[®] de volumen variable 10-100 µL y 100-1000 µL
- Espátula de acero inoxidable
- Jeringa Hamilton de vidrio de 100 µL
- Jeringas descartables marca Neojet de 1 mL
- Filtro para jeringa con membrana de nylon, de 0,45 micrones de poro y 13 mm de diámetro, marca MSI[®]
- Vaso de precipitados de 100 y 500 ml
- Tubos de vidrio borosilicato, tapa a rosca tipo Hach
- Tubos de ensayo de vidrio neutro
- Mechero Bunsen

- Botellas de vidrio color caramelo de 500 mL
- Botellas de plástico de 500 mL
- Bolsas tipo Ziploc®
- Reactor de vidrio de 500 mL, marca Pyrex®

Instrumental

- Centrífuga, marca Rolco CM2036
- Cromatógrafo líquido (HPLC), marca Agilent, modelo 1100, con fuentes de ionización ESI y APCI, teniendo como detectores en tándem a un arreglo de diodos (DAD) con rango de medición entre 190-900 nm y un espectrómetro de masas, de cuadrupólo simple, marca Agilent modelo VL, de rango de masas 50-1500 umas
- Cromatógrafo líquido de ultrapresión Acquity (UHPLC), marca Waters, con fuente ESI, acoplado a un sistema de masas Quattro Premier XE con cuadrupólo en tándem.
- Reactor DQO, marca HANNA Instruments.
- Vortex, marca DeCaLab S.R.L
- Línea de nitrógeno, calidad Industrial
- Baño termostático, marca Vicking S.R.L
- Estufa, marca Estigia®, rango de temperatura 25-100°C
- Mufla, marca Estigia®
- Balanza analítica, marca Mettler Toledo® (precisión $\pm 0,1$ mg)
- Multiparamétrico, marca Lutron® (YK-200PDO, YK-2001PH y YK-200PCT).
- Sonicador, marca TESTLAB S10, Argentina
- Espectrofotómetro UV-VIS, marca Shimadzu model UV-1203.
- Equipo de vacío Visiprep (Supelco, Bellefonte, PA)
- Sistema de purificación de agua Sartorius Arium™ (Sartorius AG, Gotinga, Países Bajos)

- Bomba peristáltica, marca Masterflex®
- Dispositivo calentador de agua, SolarMate®

Herramientas informáticas

- Paquete Microsoft Office 2016 (Word, Excel, Power Point).
- Software R (R Core Team) y paquete NADA para análisis de datos ambientales
- Software Infostat®
- Aplicación Google Maps, Google®
- Google Earth, Google®
- Maphub® versión Beta, <http://maphub.net>
- MassLinx 4.1, Waters®

Anexo II – Resultados completos de las diferentes estrategias analíticas abordadas para reportar estimadores estadísticos poblacionales

Tabla AII. Resumen completo de los resultados del análisis estadístico obtenido al comparar los 6 métodos de sustitución e imputación de datos. El resultado de la estimación Kaplan-Meier (KM) se informa para sitios con menos del 50% de censura (considerada ésta como el porcentaje de datos menores al LD), mientras que el resultado de la regresión de orden estadístico (ROE) se presenta para censura de entre el 50 y 80%.

			Valores encima del LD			Sustitución LD/2			Sustitución Sqrt(LD/2)			Kaplan-Meier (KM)			Regresión de orden estadístico (ROE)			Estimación de máxima Similitud (EMS)		
Categoría	Sección		LAS	MON	SAL	LAS	MON	SAL	LAS	MON	SAL	LAS	MON	SAL	LAS	MON	SAL	LAS	MON	SAL
RS	AP	n	2	0	0	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Media	33,75	-	-	10,29	0,85	0,85	10,50	1,20	1,20	16,43	-	-	9,78	-	-	0,10	-	-
		Mediana	33,75	-	-	0,90	0,85	0,85	1,20	1,20	1,20	-	-	-	0,19	-	-	1097,07	-	-
		Desv. estándar	34,29	-	-	21,28	0,00	0,00	21,17	0,00	0,00	24,00	-	-	21,55	-	-	1,19,E+01	-	-
		Datos faltantes	5	7	7	0	0	0	0	0	0	5	7		5	7	7	5	7	7
		% censurado										71	100	100	71	100	100	71	100	100
	BA	n	1	2	3	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Media	138,00	723,70	131,80	0,85	0,85	0,85	1,20	1,20	1,20	-	-	-	138,00	3,49	7,60	4,85,E-05	3,83,E-03	0,27
		Mediana	138,00	723,70	115,53	17,99	181,56	43,86	18,30	181,83	44,08	138,00	341,35	60,51	138,00	184,00	45,75	1,29,E+12	1,48,E+14	2,62,E+05
		Desv. estándar	0,00	720,97	81,13	48,49	431,54	73,51	48,37	431,41	73,36	-	476,87	72,06	2,14,E-14	430,41	72,31	3,43,E+28	5,69,E+30	2,59,E+11
		Datos faltantes	7	6	5	0	0	0	0	0	0	7	6	5	7	6	5	7	6	5
		% censurado										88	75	63	88	75	63	88	75	63
	GUA	n	4	19	12	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
		Media	3,55	45,64	14,80	0,85	23,51	0,85	1,20	23,51	1,20	-	22,20	-	0,26	23,51	1,10	0,05	5,57	0,47
		Mediana	4,34	77,29	20,78	1,32	49,26	8,82	1,61	49,38	9,01	2,79	49,90	9,84	0,88	50,97	8,62	1,52	938,22	63,22
		Desv. estándar	2,42	58,39	18,90	1,43	59,33	15,30	1,33	59,22	15,20	1,13	59,39	15,16	1,62	57,94	15,40	46,70	158111,10	8468,67
		Datos faltantes	26	11	18	0	0	0	0	0	0	26,00	11,00	18,00	26,00	11,00	18,00	26,00	11,00	18,00
		% censurado										87	37	60	87	37	60	87	37	60
	PAR	n	4	3	0	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Media	10,70	20,44	-	2,60	0,85	0,85	2,40	1,20	1,20	2,60	-	-	2,60	1,56	-	1,78	0,64	-
		Mediana	13,13	48,56	-	7,89	21,30	0,85	7,99	21,50	1,20	8,61	26,82	-	7,69	21,16	-	17,62	900,63	-
		Desv estándar	11,70	57,51	-	10,54	41,87	0,00	10,46	41,75	0,00	10,70	44,15	-	10,70	41,95	-	173,98	1,26,E+06	-
		Datos faltantes	3	4	7	0	0	0	0	0	0	3	4	7	3	4	7	3	4	7
		% censurado										43	57	100	43	57	100	43	57	100

			Valores encima del LD			Sustitución LD/2			Sustitución Sqrt(LD/2)			Kaplan-Meier (KM)			Regresión de orden estadístico (ROE)			Estimación de máxima Similitud (EMS)		
Categoría	Sección		LAS	MON	SAL	LAS	MON	SAL	LAS	MON	SAL	LAS	MON	SAL	LAS	MON	SAL	LAS	MON	SAL
	URU	n	4	2	2	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Media	74,35	64,33	7,30	0,85	0,85	0,85	1,20	1,20	1,20	-	-	-	0,62	9,04,E-06	0,65	0,13	0,01	0,04
		Mediana	123,65	64,33	7,30	41,78	11,43	1,93	42,02	11,71	2,22	47,35	12,85	5,47	41,50	10,72	1,80	97231,30	8691,28	9,54
		Desv. estándar	151,70	87,36	3,11	99,66	36,12	2,68	99,56	36,03	2,55	107,48	48,29	1,72	99,79	36,34	2,80	7,45,E+10	1,48,E+10	2375,05
		Datos faltantes	8	10	10	0	0	0	0	0	0	8	10	10	8	10	10	8	10	10
		% censurado										67	83	83	67	83	83	67	83	83
CP	CP	n	1	4	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Media	490,00	684,15	614,05	0,85	288,30	0,90	1,20	288,30	1,20	-	288,30	-	490,00	288,30	0,62	4,82,E-04	94,85	0,33
		Mediana	490,00	1518,35	614,05	98,68	1214,85	246,14	98,96	1214,92	246,34	490,00	1221,70	292,48	490,00	1215,04	245,77	5,98,E+15	7,82,E+04	3,69,E+08
		Desv. estándar	0,00	2147,72	757,95	218,75	1979,92	506,38	218,60	1979,87	506,26	-	2039,49	606,36	8,04E-14	1979,77	506,59	7,42,E+34	6,45,E+07	4,16,E+17
		Datos faltantes	4	1	3	0	0	0	0	0	0	4	1	3	4	1	3	4	1	3
		% censurado										80	20	60	80	20	60	80	20	60
HU	HU	n	0	1	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
		Media	-	2,55	-	0,85	0,85	0,85	1,20	1,20	1,20	-	-	-	-	2,55	-	-	0,02	-
		Mediana	-	2,55	-	0,85	0,94	0,85	1,20	1,26	1,20	-	2,55	-	-	2,55	-	-	0,28	-
		Desv. estándar	-	0,00	-	0,00	0,38	0,00	0,00	0,27	0,00	-	-	-	-	0,00	-	-	4,12	-
		Datos faltantes	20	19	20	0	0	0	0	0	0	20	19	20	20	19	20	20	19	20
		% censurado										100	95	100	100	95	100	100	95	100